

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

**Infección por el Virus de la Hepatitis C en la
era de los antivirales de acción directa:
optimización del diagnóstico, tratamiento y
progresión de la enfermedad**

Andrés Tabernilla García

A Coruña, 2019

Directoras:

Eva Poveda López

M^a de los Ángeles Castro Iglesias



La **Dra. Eva Poveda López**, investigadora principal del grupo de investigación Virología y Patogénesis del Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur y la **Dra. M^a de los Ángeles Castro Iglesias**, profesora del Área de Medicina del Departamento de Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidade da Coruña,

CERTIFICAN QUE:

La presente memoria de tesis titulada **“Infección por el Virus de la Hepatitis C en la era de los antivirales de acción directa: optimización del diagnóstico, tratamiento y progresión de la enfermedad”**, presentada por Don Andrés Tabernilla García, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendida públicamente y optar al Grado de Doctor.

Para que así conste, firman el presente certificado en A Coruña, a 22 de febrero de 2019.

Fdo.: Eva Poveda López

Fdo.: M^a de los Ángeles Castro Iglesias

Fdo.: Andrés Tabernilla García
(*Doctorando*)

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| LISTADO DE ABREVIATURAS | IX |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XIII |
| ÍNDICE DE TABLAS | XV |
| RESUMEN | 17 |
| I.- INTRODUCCIÓN | 25 |
| 1.- El Virus de la Hepatitis C | 1 |
| 1.1.- Estructura molecular del Virus de la Hepatitis C | 1 |
| 1.2.- Ciclo viral del Virus de la Hepatitis C | 3 |
| 2.- Historia natural de la infección por el Virus de la Hepatitis C | 5 |
| 3.- Epidemiología de la infección por el Virus de la Hepatitis C | 7 |
| 3.1.- Epidemiología molecular del Virus de la Hepatitis C | 9 |
| 4.- Fibrosis Hepática | 11 |
| 4.1.- Fisiopatología de la fibrosis hepática | 11 |
| 4.2.- Evaluación y monitorización de la fibrosis hepática | 13 |
| 4.3.- Factores implicados en la fibrosis hepática | 15 |
| 5.- Tratamiento frente al Virus de la Hepatitis C | 16 |
| 5.1.- Duración y monitorización del tratamiento: dinámica viral | 18 |
| 5.2.- Impacto del tratamiento en la enfermedad hepática | 20 |
| 6.- Factores genéticos implicados en la infección por el Virus de la Hepatitis C: haplogrupos de ADN mitocondrial | 21 |
| 6.1.- Haplogrupos de ADN mitocondrial e infección por el Virus de la Hepatitis C | 22 |
| 7.- Cribado del Virus de la Hepatitis C | 24 |
| II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 27 |
| III.- MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 1 | 31 |
| 1.- Diseño, ámbito de estudio | 33 |
| 2.- Sujetos de estudio | 33 |
| 3.- Obtención y procesamiento de las muestras | 34 |
| 4.- Extracción del ADN mitocondrial | 35 |
| 5.- Determinación del haplogrupo de ADN mitocondrial | 36 |
| 5.1.- Amplificación de los <i>SNPs</i> de ADNmt (<i>multiplex PCR</i>) | 38 |
| 5.2.- Purificación de los productos de <i>PCR</i> (<i>ExoSAP-IT</i>) | 40 |
| 5.3.- Extensión de Base Simple (<i>Single Base Extension</i>) y purificación de los productos de <i>PCR</i> | 40 |
| 5.4.- Secuenciación de los productos de <i>multiplex SBE</i> | 42 |
| 6.- Análisis estadístico | 42 |
| IV.- MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 2 | 45 |
| 1.- Diseño y ámbito de estudio | 47 |
| 2.- Sujetos de estudio | 47 |
| 3.- Obtención y procesamiento de las muestras | 48 |
| 4.- Cuantificación de la carga viral del VHC | 48 |
| 4.1.- Extracción del ARN viral | 50 |
| 4.2.- Generación de la recta de calibrado y cuantificación del ARN viral | 50 |
| 4.3.- Interpretación de los resultados | 51 |
| 5.- Análisis estadístico | 52 |

| | |
|--|------------|
| V.- MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 3 | 53 |
| 1.- Diseño y ámbito de estudio | 55 |
| 2.- Sujetos de estudio y cálculo del tamaño muestral | 55 |
| 3.- Prueba de Cribado: OraQuick HCV Rapid Antibody Test | 57 |
| 4.- Pruebas de diagnóstico: confirmación de los resultados positivos en la prueba de cribado | 58 |
| 5.- Seguimiento de los sujetos con pruebas de diagnóstico positivas | 59 |
| 6.- Análisis estadístico | 59 |
| VI.- RESULTADOS DEL OBJETIVO 1 | 61 |
| 1.- Características basales de la población de estudio | 63 |
| 2.- Prevalencia de los haplogrupos de ADN mitocondrial | 66 |
| 3.- Relación de los haplogrupos de ADN mitocondrial con el desarrollo y progresión de la infección por VHC | 67 |
| 4.- Relación de los haplogrupos de ADN mitocondrial con el genotipo viral del VHC | 68 |
| 5.- Relación de los haplogrupos de ADN mitocondrial con los niveles de fibrosis hepática | 69 |
| 6.- Relación de los haplogrupos de ADN mitocondrial con el desarrollo de cirrosis hepática | 70 |
| VII.- RESULTADOS DEL OBJETIVO 2 | 73 |
| 1.- Características basales de la población de estudio | 75 |
| 2.- Tratamiento antiviral frente al VHC y dinámica viral del VHC | 76 |
| 2.1.- Tratamiento antiviral frente al VHC | 76 |
| 2.2.- Dinámica viral del VHC durante el tratamiento | 78 |
| VIII.- RESULTADOS DEL OBJETIVO 3 | 83 |
| 1.- Características de la población de estudio | 85 |
| 2.- Programa de cribado | 86 |
| 3.- Características de los sujetos con infección crónica confirmada tras el programa de cribado | 87 |
| 4.- Estimación de la infección por VHC en personas nacidas entre 1960- 1969 en el área sanitaria de A Coruña y Galicia | 88 |
| IX.- DISCUSIÓN | 91 |
| X.- CONCLUSIONES | 103 |
| XI.- BIBLIOGRAFÍA | 107 |
| XII.- ANEXOS | 121 |

LISTADO DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|---|
| AADs | Antivirales de acción directa |
| AASLD | <i>American Association for the Study of Liver Diseases</i> |
| Abs | Absorbancias |
| acVHC | Anticuerpos frente al VHC |
| acVHC+ | Anticuerpos positivos frente al VHC |
| ADN | Ácido desoxiribonucleico |
| ADNmt | Ácido desoxiribonucleico mitocondrial |
| ADVP | Adictos a Drogas por Vía Parenteral |
| ALT | Alaninotransferasa |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARN-VHC+ | Carga viral del VHC positiva |
| AST | Aminotransferasa |
| ATP | <i>Adenosin triphosphate</i> |
| CDC | <i>Center for Disease Control and Prevention</i> |
| CEH | Células estrelladas hepáticas |
| CEI | Comité Ético de Investigación |
| CHC | Carcinoma hepatocelular |
| CLDN-1 | <i>Claudin-1</i> |
| cop/mL | Copias por mililitro |
| CRS | <i>Cirrosis risk score</i> |
| CS | Centro de salud |
| C_t | <i>Cycle treshold</i> |
| D₀ | Determinación basal |
| D₃ | Carga viral de VHC a día 3 |
| DBS | <i>Dried blood spot tests</i> |
| DCV | Daclatasvir |
| ddNTPs | <i>Dideoxynucleotides triphosphate</i> |
| dNTPs | <i>Deoxynucleotides triphosphate</i> |
| EASL | <i>European Association for the Study of the Liver</i> |
| ECDC | <i>Euroepan Centre for Disease Prevention and Control</i> |
| EDTA | <i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> |
| EEUU | Estados Unidos |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| EOT | <i>End of treatment</i> |
| ET | Elastografía de transición |
| Exo-I | Exonucleasa-1 |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| GGT | Gamma glutamil transpeptidasa |
| GHSS | <i>Global Health Sector Strategy</i> |
| GWAS | <i>Genome Wide Association Studies</i> |

| | |
|--------------------------------|---|
| HSH | Hombres que tienen sexo con hombres |
| IC | Intervalo de confianza |
| IFN | Interferón |
| IFN-α | Interferón-alpha |
| IGE | <i>Instituto Galego de Estadística</i> |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| INIBIC | Instituto de Investigación Biomédica de La Coruña |
| IRES | <i>Internal Ribosome Entry Sites</i> |
| ISGs | <i>IFN-stimulated genes</i> |
| kPa | Kilopascales |
| Kvolt | Kilovoltios |
| LDL receptor | <i>Low Density Lipoprotein receptor</i> |
| LDLs | <i>Low density lipoproteína</i> |
| LDV | Ledipasvir |
| LLOD | <i>Lower limit of detection</i> |
| log | Logaritmo |
| LVPs | <i>Lipo-Viroparticles</i> |
| MEC | Matriz extracelular |
| MgCl₂ | Cloruro de magnesio |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| mV | Milivoltios |
| NaN₃ | Acida de sodio |
| NASH | <i>non-alcoholic steatohepatitis</i> |
| ND | No detectable |
| ng | Nanogramos |
| NGS | <i>Next generation sequencing</i> |
| NOHL | Neuropatía óptica de Lever |
| nt | Nucleótidos |
| OCLN | <i>Ocludin</i> |
| OMS | Organización mundial de la salud |
| OR | <i>Odds ratio</i> |
| ORF | <i>Open Reading Frame</i> |
| pb | Pares de bases |
| PBMCs | <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>Polimerase Chain Reaction</i> |
| PCR-RFLP | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR</i> |
| PDGF | <i>Platellet derived growth factor</i> |
| PEAHC | Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud |
| pegIFN | Interferón pegilado |
| PNPLA3 | <i>Patatin-like phospholipase-3</i> |

| | |
|--------------------------------|--|
| POCTs | <i>point-of-care tests</i> |
| POP4 | <i>Performance Optimized Polymer 4</i> |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| RBV | Ribavirina |
| RER | Retículo endoplasmático rugoso |
| RNA-seq | <i>RNA-sequencing</i> |
| Rnasa | ribonucleasa |
| ROS | <i>Reactive oxygen species</i> |
| RT-PCR | PCR de transcripción reversa |
| RVS | Respuesta viral sostenida |
| RVS₁₂ | Respuesta viral sostenida tras 12 semanas desde el fin del tratamiento |
| RVS₂₄ | Respuesta viral sostenida tras 24 semanas desde el fin del tratamiento |
| SAP | <i>Shrimp alkaline phosphatase</i> |
| SBE | <i>Single Base Extension</i> |
| SERGAS | <i>Servizo Galego de Saúde</i> |
| SIDA | Síndrome de inmunodeficiencia adquirida |
| SMV | Simeprevir |
| SNPs | <i>Single nucleotide polymorphism</i> |
| SOF | Sofosbuvir |
| SR-BI | <i>Scavenger Receptor Class B type I</i> |
| TAR | Tratamiento antiretroviral |
| TGF-α | <i>Transforming growth factor-α</i> |
| TGF-β | <i>Transforming growth factor-β</i> |
| TH | Transplante hepático |
| TIMS | <i>Tissular inhibitos of metalloproteinases</i> |
| TND | <i>Target not detected</i> |
| UI/mL | Unidades internacionales por mililitro |
| UTRs | <i>Unstraslated Regions</i> |
| VAR | Variantes asociadas a resistencia |
| VHA | Virus de la Hepatitis A |
| VHB | Virus de la Hepatitis B |
| VHC | Virus de la Hepatitis C |
| VIH | Virus de la Inmunodeficiencia Humana |
| VLDLs | <i>Very low density lipoproteins</i> |
| vs | <i>Versus</i> |
| XXIAC | <i>Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña</i> |
| XXIAF | <i>Xerencia de Xestión Integrada de Ferrol</i> |
| °C | <i>Grados centígrados</i> |
| 2D | Ombitasvi+paritaprevir+ritonavir |
| 3D | Ombitasvi+paritaprevir+ritonavir+dasabuvir |

χ^2

Chi-cuadrado

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura del Virus de la Hepatitis C..... | 1 |
| Figura 2. Organización genética y procesado de la poliproteína del Virus de la Hepatitis C. | 2 |
| Figura 3. Ciclo viral del Virus de la Hepatitis C..... | 5 |
| Figura 4. Historia natural del Virus de la Hepatitis C | 6 |
| Figura 5. Distribución mundial de los genotipos del Virus de la Hepatitis C..... | 10 |
| Figura 6. Mapa de la distribución global de los haplogrupos de ADN mitocondrial y sus relaciones filogenéticas..... | 23 |
| Figura 7. Esquema explicativo del principio de la técnica de Extensión de base simple (<i>Single Base Extension, SBE</i>). | 37 |
| Figura 8. Electroferograma obtenido del <i>software</i> de análisis de secuencias <i>GeneMapper v3.5</i> | 37 |
| Figura 9. Cronograma seguido para la determinación de la carga viral del VHC en función de la duración del tratamiento (12 ó 24 semanas). | 47 |
| Figura 11. Esquema en el que se recoge el principio de detección de la prueba de cribado <i>OraQuick HCV Rapid Antibody Test</i> | 58 |
| Figura 12. Diagrama del flujo de trabajo llevado a cabo para la realización del estudio de cribado de la infección por VHC en los cuatro centros de salud seleccionados. | 60 |
| Figura 13. Distribución de la prevalencia de los haplogrupos de ADN mitocondrial en la población de estudio | 67 |
| Figura 14. Distribución de los principales genotipos virales del VHC en los diferentes <i>clusters</i> de haplogrupos de ADN mitocondrial..... | 68 |
| Figura 15. Distribución de la dureza hepática (kPa) en de los pacientes del estudio en función del haplogrupo de ADN mitocondrial..... | 69 |
| Figura 16. Distribución del grado de fibrosis en escala METAVIR, entre los diferentes <i>clusters</i> de haplogrupos de ADN mitocondrial..... | 70 |
| Figura 17. Distribución de la cirrosis hepática, definida como valores de dureza hepática superiores a 12,5 kPa, entre los entre los diferentes <i>clusters</i> de haplogrupos de ADN mitocondrial. | 71 |
| Figura 18. Diagrama de bosque con los factores asociados a la presencia de cirrosis hepática (>12,5 kPa)..... | 72 |
| Figura 19. Dinámica viral del VHC de cada uno de los pacientes del estudio a lo largo del periodo de tratamiento y postratamiento..... | 78 |
| Figura 20. Dinámica viral del VHC a lo largo del periodo de tratamiento y postratamiento en función del régimen de AADs administrado. | 80 |
| Figura 21. Proporción de pacientes con cargas virales no detectables a semanas 4, 8 y fin del tratamiento..... | 81 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla I. Principales métodos no invasivos empleados en la actualidad para la evaluación de la fibrosis hepática. | 14 |
| Tabla II. Principales factores implicados en la fibrosis hepática. | 15 |
| Tabla III. Antivirales de Acción Directa disponibles actualmente para el tratamiento de la Hepatitis C de acuerdo a su diana terapéutica. | 18 |
| Tabla IV. Relación entre el grado de dureza hepática (kPa) y el grado de fibrosis según la escala METAVIR. | 33 |
| Tabla V. Posiciones polimórficas del ADNmt analizados para la determinación de los seis haplogrupos mitocondriales europeos más comunes (H,V,K,U,T,J), del <i>cluster Others</i> (I, W, X) y del haplogrupo minoritario SHV. | 38 |
| Tabla VI. Secuencias de los cebadores empleados en la <i>multiplex PCR</i> para la amplificación de las seis posiciones polimórficas del ADNmt analizadas. | 39 |
| Tabla VII. Secuencias de los cebadores empleados en la <i>multiplex SBE</i> para la determinación de la secuencia de los seis polimorfismos de un solo nucleótido (<i>SNPs</i>) del ADNmt analizados. | 41 |
| Tabla VIII. Cálculo del número de pruebas de cribado necesarias para detectar, con un nivel de confianza del 95% y una precisión del 0,5%, prevalencias de acVHC+ del 0,5-3,0%. La tabla recoge también, para cada prevalencia, el número de caso de acVHC+ esperados. | 56 |
| Tabla IX. Características sociodemográficas epidemiológicas, clínicas y virológicas de la población de estudio. | 64 |
| Tabla X. Estado de la infección por VIH en los pacientes co-infectados VIH-VHC. | 66 |
| Tabla XI. Características sociodemográficas epidemiológicas, clínicas y virológicas basales de la población de estudio. | 75 |
| Tabla XII. Características basales de la población de estudio en relación al tratamiento previo del VHC y combinaciones terapéuticas empleadas en el estudio. | 77 |
| Tabla XIII. Características de la población seleccionada en los cuatro centros de salud previa a la realización del programa de cribado. | 86 |
| Tabla XIV. Distribución de la población seleccionada en los cuatro centros de salud para llevar a cabo el programa de cribado y resultados obtenidos tras la realización del mismo. | 87 |
| Tabla XV. Principales características epidemiológicas, clínicas y virológicas de los dos pacientes con infección crónica por VHC derivados del programa de cribado. | 88 |
| Tabla XVI. Estimación de la infección por VHC no diagnosticada y de la seroprevalencia del VHC en personas nacidas entre 1960 y 1969 en la ciudad de A Coruña, su área sanitaria y la comunidad autónoma gallega. | 89 |

RESUMEN

Resumen

La infección por el Virus de la Hepatitis C (VHC) es un problema grave de salud pública a escala mundial que afecta a más de 71 millones de personas en todo el mundo. La infección por VHC se caracteriza por la acumulación progresiva de fibrosis hepática que, en estadios finales de la enfermedad, lo que conduce al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular. La introducción de los antivirales de acción directa (AADs) ha marcado un hito en la historia del tratamiento frente al VHC, al permitir alcanzar tasas de respuesta viral sostenida (RVS) superiores al 90%, haciendo cada vez más plausible la erradicación de la infección. No obstante, en este nuevo escenario terapéutico sigue siendo necesaria una optimización tanto de los tratamientos como de su monitorización, así como la búsqueda de marcadores que permitan identificar poblaciones con mayor riesgo de progresión de la enfermedad. Además, cabe destacar que, pese a la alta eficacia de los AADs, se estima que un 80% de la infección por VHC a nivel mundial continua sin ser diagnosticada, por lo que se requiere de la implementación y optimización de programas de cribado activos que permitan identificar aquellas personas infectadas por el VHC.

En este contexto los objetivos de este trabajo fueron, en primer lugar, caracterizar y evaluar el impacto de los haplogrupos europeos de ADN mitocondrial en la evolución clínica de la infección por VHC. En segundo lugar, analizar y describir la dinámica viral y su utilidad en la optimización de la duración y monitorización de los tratamientos basados en AADs. El último de los objetivos se basó en el desarrollo de un programa de cribado, con el fin de identificar posibles infecciones no diagnosticada y estudiar la seroprevalencia del VHC en la ciudad de A Coruña.

Los resultados obtenidos mostraron una asociación entre la fibrosis hepática y los haplogrupos europeos de ADN mitocondrial, poniendo de manifiesto su posible utilidad como marcadores de progresión del daño hepático. En relación a la dinámica viral en los regímenes basados en AADs, se observó una caída bifásica de la carga viral del VHC, caracterizada por un rápido descenso en los primeros días de tratamiento. Además, a pesar de que la proporción de pacientes con cargas virales indetectables a semana 4 y 8 fue baja, todos alcanzaron RVS. Estos resultados sugerían la necesidad de re-evaluar las reglas de monitorización de la carga viral en el contexto de las nuevas terapias con AADs, así como la duración de las mismas. Finalmente, la realización del programa de cribado mostró que la seroprevalencia de la infección por VHC en sujetos nacidos entre 1960-1969 fue del 2,05% y que tan solo el 29,8% de la población contaba con pruebas serológicas previas. La prevalencia de infección por

VHC en personas que desconocían su estado serológico fue del 0,26%. Los resultados obtenidos ha permitido una mejora en el conocimiento de la epidemiología de la infección por VHC en la ciudad de A Coruña y deberían de ser considerados a la hora de implementar futuras estrategias de cribado en busca de la erradicación de la infección por VHC en España.

Resumo

A infección polo Virus da Hepatite C (VHC) é un problema grave de saúde pública a escala mundial que afecta a máis de 71 millóns de persoas en todo o mundo. A infección por VHC caracterízase pola acumulación progresiva de fibrose hepática que, en estadios finais da enfermidade, conduce ao desenvolvemento de cirrosis e carcinoma hepatocelular. A introdución dos antivirais de acción directa (AADs) marcou un fito na historia do tratamento fronte ao VHC, ao permitir alcanzar taxas de resposta viral sostida (RVS) superiores ao 90%, facendo cada vez máis plausible a erradicación da infección. Con todo, neste novo escenario terapéutico segue sendo necesaria unha optimización tanto dos tratamentos como da súa monitoraxe, así como a procura de marcadores que permitan identificar poboacións con maior risco de progresión da enfermidade. Ademais, cabe destacar que, a pesar da alta eficacia dos AADs, estímase que un 80% da infección por VHC a nivel mundial continua sen ser diagnosticada, polo que se require da implementación e optimización de programas de cribado activos que permitan identificar aquelas persoas infectadas polo VHC.

Neste contexto os obxectivos deste traballo foron, en primeiro lugar, caracterizar e avaliar o impacto dos haplogrupos europeos de ADN mitocondrial na evolución clínica da infección polo VHC. En segundo lugar, analizar e describir a dinámica viral e a súa utilidade na optimización da duración e monitoraxe dos tratamentos baseados en AADs. O último dos obxectivos baseouse no desenvolvemento dun programa de cribado, co fin de identificar posibles infeccións non diagnosticada e estudar a seroprevalencia do VHC na cidade da Coruña.

Os resultados obtidos mostraron unha asociación entre a fibrose hepática e os haplogrupos europeos de ADN mitocondrial, poñendo de manifesto a súa posible utilidade como marcadores de progresión do dano hepático. En relación á dinámica viral nos réximes baseados en AADs, observouse unha caída bifásica da carga viral do VHC, caracterizada por un rápido descenso nos primeiros días de tratamento. Ademais, a pesar de que a proporción de pacientes con cargas virales indetectables a semana 4 e 8 foi baixa, todos alcanzaron RVS. Estes resultados suxiren a necesidade de re-avaliar as regras de monitoraxe da carga viral no contexto das novas terapias con AADs, así como a duración das mesmas. Finalmente, a realización do programa de cribado mostrou que a seroprevalencia da infección por VHC en suxeitos nados entre 1960-1969 foi do 2,05% e que tan só o 29,8% da poboación contaba con probas serolóxicas previas. A prevalencia de infección por VHC en persoas que descoñecían o seu estado serolóxico foi do 0,26%. Os resultados obtidos permitiron mellorar o

coñecemento da epidemioloxía da infección polo VHC na cidade da Coruña e deberían de ser considerados á hora de implementar futuras estratexias de cribado en busca da erradicación da infección polo VHC en España.

Abstract

Hepatitis C Virus (HCV) infection is a major worldwide health problem with more than 71 million infected people around the world. HCV infection is characterized by progressive liver fibrosis accumulation leading to cirrhosis and hepatocellular carcinoma development in end-stages of the disease. Direct-acting antivirals (DAAs) has represented a remarkable milestone in the history of HCV treatment, since they have allowed to reach more than 90% of sustained viral response (SVR) and therefore, making more plausible the HCV global eradication. Nonetheless, in this new therapeutic scenario, it is still necessary to optimize not only the treatments and their monitoring, but also the seek for markers which allows the identification of high-risk populations. Moreover, it is important to highlight that even the high efficacy rates of DAAs, it has been estimated that approximately 80% of worldwide infected-patients are not aware of their diagnose. Thus, it is necessary to implement and optimize active screening programs in order to identify this kind of populations.

In this context, the objectives of this study have been, firstly, to characterize and evaluate the impact of European mitochondrial DNA haplogroups in the outcome of HCV infection. Secondly, to analyze and describe viral dynamics and its usefulness for the optimization of treatment monitoring and duration. Finally, the last objective has been to develop a screening program that allows identifying non-diagnosed HCV infections in the city of A Coruña, and evaluating the HCV seroprevalence in this area.

The results obtained showed an association between hepatic fibrosis and European haplogroups of mitochondrial DNA, thus highlighting their possible usefulness as markers for liver damage progression. According to the viral dynamics in regimens based on DAAs, a biphasic decline of HCV viral load was observed. It was characterized by a rapid decrease during first days of treatment. In addition, although the proportion of patients with undetectable viral loads at week 4 and 8 was low, all of them reached SVR. These results suggest the need of re-evaluating viral load monitoring rules, as well as their duration in the context of new therapies with DAAs. Finally, screening program implementation showed that the seroprevalence of HCV infection in subjects born between 1960-1969 was 2.05%, and that only 29.8% of the population had been serologically tested. The prevalence of HCV infection in people who did not know their serological status was 0.26%. The results obtained have allowed an improvement in the knowledge of HCV-infection epidemiology in the city of A Coruña, and it should be considered when implementing future screening strategies in the search for the eradication of HCV infection in Spain.

I.- INTRODUCCIÓN

1.- El Virus de la Hepatitis C

1.1.- Estructura molecular del Virus de la Hepatitis C

El Virus de la de la Hepatitis C (VHC) fue descubierto en el año 1989 como el agente causal de aquellas hepatitis agudas y crónicas que no podían asociarse al Virus de la Hepatitis A (VHA) y B (VHB), siendo definido en un primer momento como el virus de la hepatitis no-A, no-B¹. Filogenéticamente, el VHC, pertenece a la familia *Flaviridae*, género *Hepacivirus*². A nivel morfológico (**Figura 1**), los viriones son partículas esféricas de 50 a 60 nanómetros (nm) de diámetro, protegidas por una bicapa lipídica (envuelta viral) en la que se insertan las glicoproteínas E1 y E2. Internamente a la envuelta, el virus posee una nucleocápside formada por proteínas del *core*, en cuyo núcleo se encuentra el genoma viral³. Además de la envuelta viral, los viriones del VHC circulan asociados con estructuras lipoproteicas (triglicéridos y apolipoproteínas B y E) o también denominadas lipoproteínas de baja/muy baja densidad (*Low density lipoproteins*, *LDLs*; *Very low density lipoproteins*, *VLDLs*) del huésped. El conjunto de lipoproteína-virión, se conoce como lipo-viropartículas (*Lipo-Viroparticles*, *LVPs*)⁴.

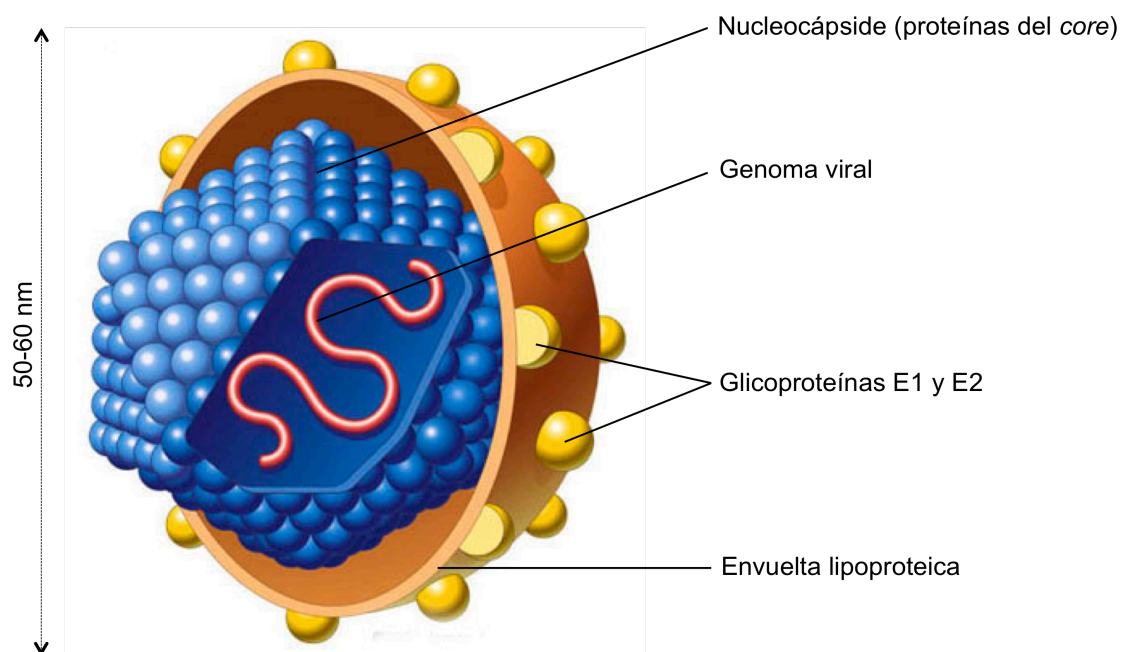


Figura 1. Estructura del Virus de la Hepatitis C.

El genoma del VHC está constituido por una única molécula de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario, de polaridad positiva y de aproximadamente 9.600 nucleótidos (nt). El VHC presenta una amplia región codificante, con un único marco de lectura abierta (*Open Reading Frame*, *ORF*), que codifica para una poliproteína precursora de unos 3000 aminoácidos, a partir de la cual, tras el procesamiento por enzimas del

virus y del huésped, da lugar a las proteínas estructurales (proteínas del core y las glicoproteínas E1 y E2) y no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B)⁵. Externamente a la región codificante, flanqueando sus extremos 3' y 5', el genoma viral posee dos zonas no codificantes (*Untranslated Regions, UTRs*) esenciales para el desarrollo del ciclo viral. La región 5'-UTR, constituida por 341 nt, está altamente conservada y actúa como el lugar de entrada al ribosoma (*Internal Ribosome Entry Sites, IRES*), siendo necesaria para la traducción del ARN viral. Por su parte, la región 3'-UTR, constituida por 150-300 nt, presenta una mayor variabilidad según los diferentes genotipos virales y participa tanto en el inicio de la replicación de la cadena de polaridad negativa, como en la unión con ciertas proteínas celulares⁶. En la **Figura 2** se representa la organización del genoma del VHC, así como las diferentes proteínas virales codificadas por el mismo.

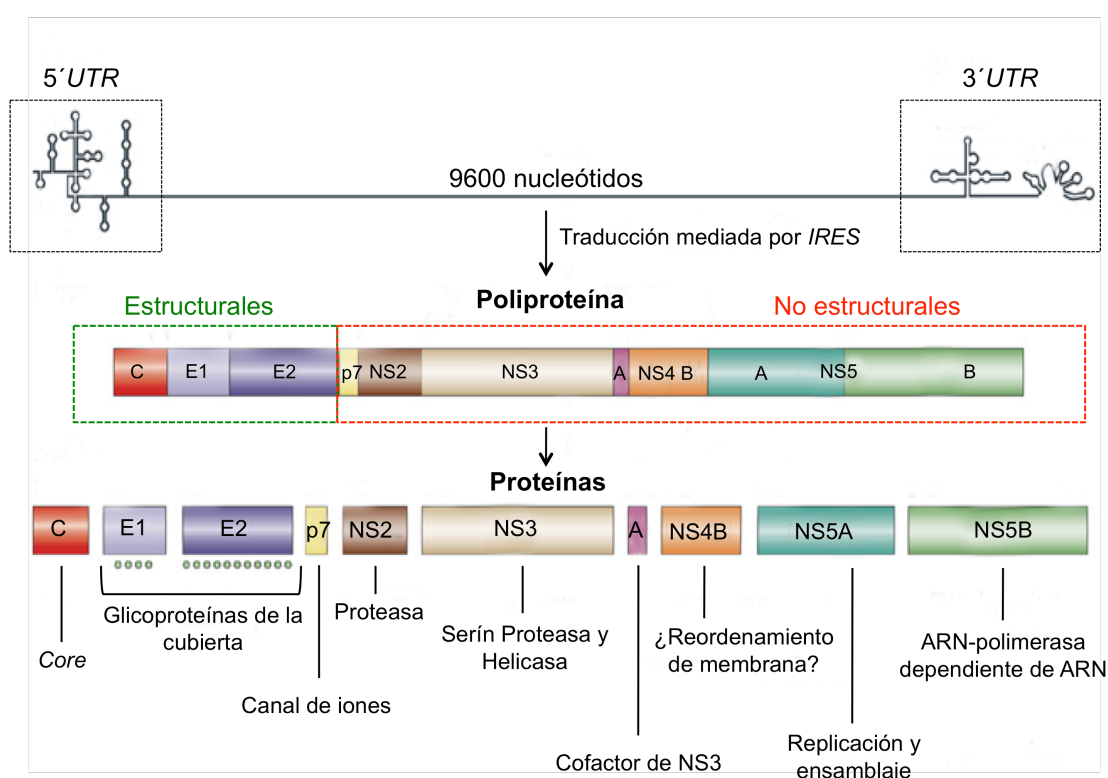


Figura 2. Organización genética y procesamiento de la poliproteína del Virus de la Hepatitis C. Adaptada de Moradpour y colaboradores⁷. IRES: *Internal Ribosome Entry Sites*; UTRs: *Untranslated Regions*.

Las proteínas virales estructurales son aquellas que forman parte de la partícula viral. Así, la proteína altamente conservada del core, participa en el ensamblaje y encapsulación de las partículas virales; mientras que las glicoproteínas de envuelta, E1 y E2, participan en el proceso de adhesión del virus a las células del huésped y se caracterizan por poseer regiones con alta variabilidad.

Por su parte, las proteínas virales no estructurales están implicadas en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación viral. Así, la proteína p7 o viroporina, es un canal de iones implicado en el ensamble y liberación de las partículas virales⁸; las proteínas NS2 y NS3, debido a su actividad proteasa y serín proteasa-helicasa respectivamente, participan en el procesamiento de la poliproteína⁵; la proteína NS4, procesada en dos subunidades, actúa como un cofactor de la actividad serín-proteasa de NS3 (NS4A) y parece tener, entre otras muchas funciones, un papel en el reordenamiento de membrana y como proteína de andamio en el complejo de replicación (NS4B)⁹; la proteína NS5, al igual que la NS4, es procesada en dos subunidades con diferentes funciones. La fosfoproteína NS5A parece jugar un papel crítico en diferentes niveles de la replicación y ensamblaje del VHC¹⁰, mientras que la proteína NS5B, debido a su actividad ARN-polimerasa dependiente de ARN, es responsable de la replicación del genoma viral.

Una característica importante de las proteínas que forman parte del VHC, especialmente las proteínas del *core*, la NS3 y la NS5A, es el elevado número de funciones que desempeñan, no sólo a nivel del ciclo viral sino también a nivel del huésped. Así, se han descrito numerosas interacciones entre dichas proteínas y proteínas diana del huésped, que permiten al virus modular un alto número de funciones celulares, tales como el metabolismo de los lípidos, las rutas de apoptosis, la respuesta inmune innata o la autofagia^{10, 5, 11, 12}.

1.2.- Ciclo viral del Virus de la Hepatitis C

La ausencia de un sistema de cultivo *in vitro* que permitiese la propagación eficiente del VHC, ha dificultado el estudio de los mecanismos implicados en la replicación viral. El desarrollo de replicones de VHC y de partículas virales infectivas en sistemas de cultivo de tejidos, han supuesto un hito en este campo y han permitido elucidar los mecanismos del ciclo viral del VHC desconocidos hasta el momento^{13, 14}.

El ciclo viral del VHC (**Figura 3**) comienza cuando las partículas virales asociadas a *LDLs* y *VLSLs* circulantes en sangre, llegan al hígado y entran en contacto con los hepatocitos, la principal diana celular del virus. El mecanismo de entrada del VHC en el hepatocito no es del todo conocido, aunque se ha sugerido que podría estar mediado por la interacción de las apolipoproteínas de las VPs, las glicoproteínas E1 y E2 de la envuelta viral y receptores y proteínas localizadas en la membrana del hepatocito [receptor de lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoprotein receptor*, *LDL receptor*), receptor *Scavenger* clase B tipo I (*Scavenger Receptor Class*

B type I, SR-BI), Claudina-1 (*Claudin-1, CLDN-1*) y ocludinas (*occludin, OCLN*) entre otros]^{15,16} (**Figura 3, paso 1**). La interacción de estos elementos produce la invaginación de la membrana del hepatocito, en un proceso dependiente de clatrina, que finalmente conduce a la formación de las vesículas endosomales (**Figura 3, paso 2**). Una vez formadas, las vesículas penetran en el citoplasma del hepatocito en donde, por diversos mecanismos, se fusionan con la envuelta viral, produciéndose la salida de la nucleocápside al citoplasma del hepatocito (**Figura 3, paso 3**) y la posterior liberación del ARN viral, para dar paso al inicio de la traducción y replicación del mismo¹⁵.

El proceso de traducción del ARN viral en la poliproteína viral tiene lugar gracias a la interacción del *IRES* (5' *UTR*) con los ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso (RER) (**Figura 3, pasos 3 y 4**). Una vez obtenida la poliproteína, ésta es procesada por las proteasas virales y celulares, dando lugar a las proteínas virales. Estas proteínas permanecerán fuertemente unidas a las membranas intracelulares, formando un complejo de replicación asociado a membrana, conocido como red membranosa (*membranous web*) (**Figura 3, paso 5**). En este complejo, la cadena positiva de ARN-VHC se utiliza como molde para la síntesis de la cadena de ARN negativa, la cual por su parte, servirá como molde para la síntesis de nuevas cadenas positivas de ARN⁷ (**Figura 3, paso 6**). En este punto, las nuevas copias de ARN de cadena positiva, debido a su interacción con las proteínas del *core*, dan lugar a la formación de la nucleocápside viral (**Figura 3, paso 7**). Los últimos pasos de maduración del virión (adquisición de la envuelta viral), son llevados a cabo en el lumen del RER y en el aparato de Golgi¹⁷ (**Figura 3, paso 8**).

La exportación de los viriones fuera de la célula, a día de hoy continúa siendo un tema poco conocido, en el que parece jugar un papel importante las gotas lipídicas, el RER y las vías de secreción de lipoproteínas^{17,18} (**Figura 3, paso 9**).

Tal y como se ha indicado anteriormente, el genoma del VHC no presenta una fase de integración en el núcleo de las células del huésped, realizándose todo su ciclo a nivel del citoplasma del hepatocito. Debido a esto, la persistencia de la infección por el VHC requiere de la generación continua de nuevas moléculas de ARN viral. En este contexto, el desarrollo de fármacos que ayudan a bloquear o bloquean de forma activa la replicación viral ha permitido la curación de la infección por VHC. El tratamiento frente al VHC será discutido en mayor profundidad en el apartado 5 de la Introducción.

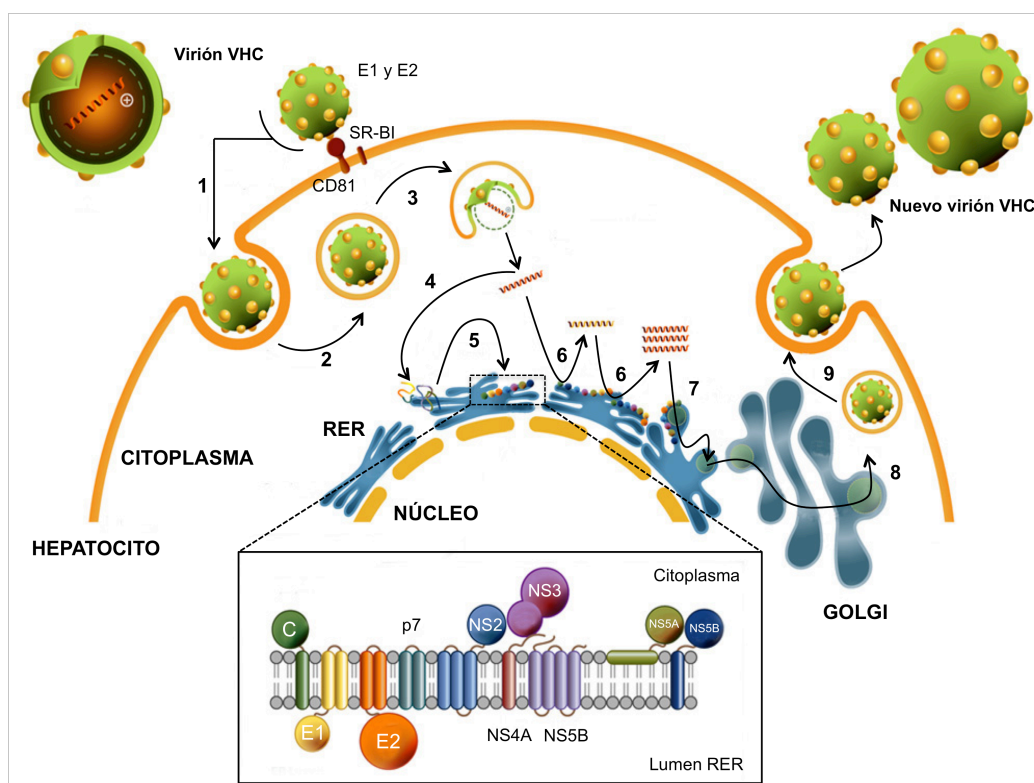


Figura 3. Ciclo viral del Virus de la Hepatitis C. 1) Entrada del VHC en el hepatocito (endocitosis), 2) Formación de la vesícula endosomal, 3) Fusión de las membranas, liberación de la nucleocápside y del genoma al citoplasma del hepatocito, 4) traducción, 5) procesamiento, 6) replicación del genoma viral, 7) ensamblaje de los viriones, 8) maduración de los viriones y 9) exportación de los nuevos viriones. Adaptada de <http://itskarenhoyt.tumblr.com/>. C: proteína del core; CD81: cluster de diferenciación 81; E1: Glicoproteína E1; E2: Glicoproteína E2; RER: Retículo endoplasmático rugoso; SR-BI: Scavenger Receptor Class B type I; VHC: Virus de la Hepatitis C.

2.- Historia natural de la infección por el Virus de la Hepatitis C

La historia natural de la infección por el VHC se caracteriza por ser un proceso lento, con un amplio periodo asintomático en la mayor parte de los pacientes, muchos de los cuales son identificados como portadores de la enfermedad en las fases finales de la misma, cuando la sintomatología hepática se hace evidente en forma de cirrosis, descompensaciones hepáticas, complicaciones extrahepáticas y carcinoma hepatocelular (CHC). La ausencia de una sintomatología clara en los primeros estadios de la infección, ligado a la larga duración de la enfermedad, hacen que la historia natural de la infección por VHC haya sido evaluada mediante estudios retrospectivos, basados en cohortes heterogéneas y factores confusores con un alto impacto en la evolución de la infección¹⁹. De este modo, la historia natural de la infección por VHC continua siendo, hoy en día, objeto de estudio. En la **Figura 4**, se

recoge la historia natural de la infección por VHC, así como los factores que influyen en las diferentes fases de la misma.

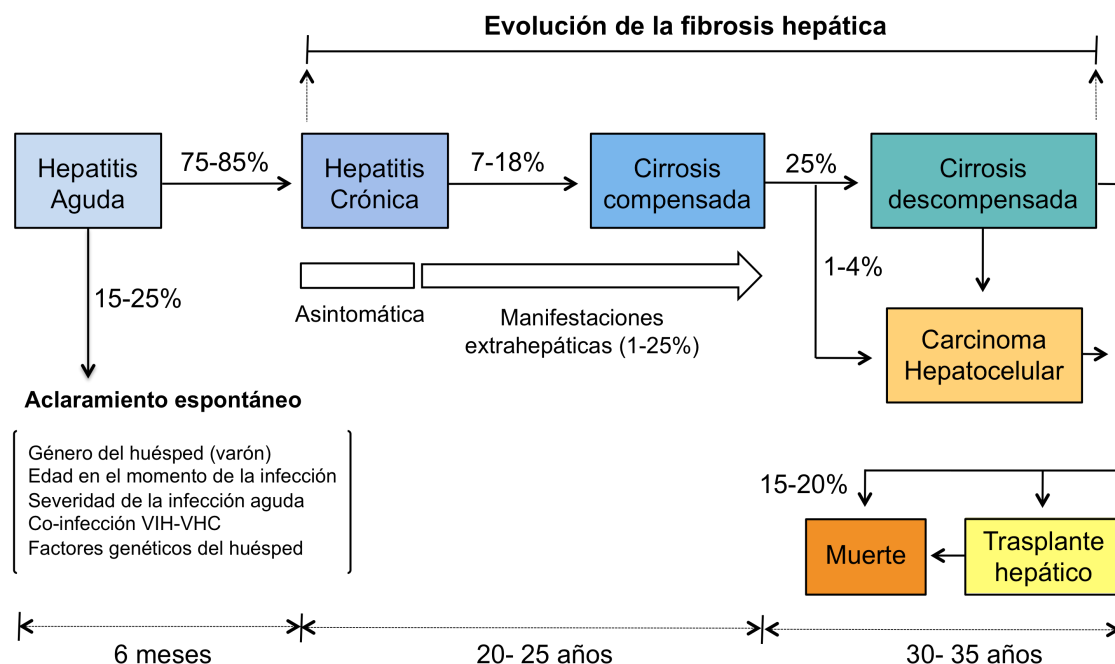


Figura 4. Historia natural del Virus de la Hepatitis C. VHC: Virus de la Hepatitis C; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

La infección por el VHC se inicia con la denominada fase aguda de la infección o hepatitis aguda. El proceso agudo es asintomático en el 80% de los casos y, en el caso de que aparezcan síntomas clínicos, éstos son inespecíficos (sintomatología similar a una gripe). En un número bajo de pacientes, la infección aguda por VHC se manifiesta en forma de ictericia u otros fenómenos más característicos de dicha infección. Durante la fase aguda, la carga viral del VHC puede detectarse tras 1-2 semanas desde la infección y se eleva hasta alcanzar niveles de 10^5 - 10^7 UI/mL (Unidades Internacionales/mililitro), que, en ausencia de tratamiento, permanecerán constantes durante el resto de fases de la infección^{20,21}.

Dentro de la fase aguda, una baja proporción de pacientes (15,0-25,0%) pueden aclarar de forma espontánea la infección por VHC, mientras que el 75,0-85,0% progresa hacia la cronificación de la enfermedad (fase de infección crónica)²⁰. La tasa de aclaramiento espontáneo es altamente variable en función de los estudios analizados y parece estar influida por distintos factores del huésped y del virus²². Algunos de los principales factores son: el género del paciente²³, la edad en el momento de la infección por el virus²⁴, la severidad de la infección aguda²² o la co-infección con otros virus como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)²⁵. Por

su parte, factores genéticos del paciente relacionados con la respuesta inmune, tales como polimorfismos en el gen de la interleucina 28B (IL-28B) y/o la presencia de ciertos alelos del complejo de mayor de histocompatibilidad (*Major histocompatibility complex, MHC*) han sido también identificados como factores con impacto en la tasa de aclaramiento espontáneo^{23,26}. Además, la alta diversidad genética del VHC parece jugar un papel importante en la cronificación de la enfermedad al facilitar el escape de la respuesta del sistema inmune del huésped²⁷.

La fase de infección crónica se define por la persistencia de ARN del VHC detectable en el plasma tras un periodo 6 meses desde el comienzo de la infección. Esta fase se caracteriza por ser una fase larga, de progresión lenta, en la que se produce una inflamación hepática persistente, la cual conduce al desarrollo y acumulación de fibrosis hepática y, en último término, de cirrosis hepática¹⁹. Al igual que el aclaramiento espontáneo de la infección, el curso natural de la fase crónica varía según las características del paciente. En el apartado 4.3 de la Introducción se detallan los principales factores implicados en la progresión de la infección crónica por VHC. De forma general, se estima que aproximadamente el 80% de los pacientes con infección crónica experimentará una evolución estable sin una progresión significativa a cirrosis en los 20 años siguientes al momento de la infección, mientras que un 7,0-18,0% desarrollará una cirrosis compensada en los 20-25 años siguientes a la infección²⁸. Durante el periodo de infección crónica, el 1,0-25,0% de los pacientes puede presentar manifestaciones extrahepáticas directamente relacionadas con la infección por VHC entre las que destacan la crioglobulinemia, depresión, diabetes mellitus, depresión y enfermedad renal crónica²⁹.

Durante la fase final de la historia natural del VHC se produce el desarrollo de cirrosis descompensada (ascitis, encefalopatía, hemorragia por varices esofágicas) en el 25,0% de los pacientes cirróticos²⁹ y la aparición de CHC en aproximadamente el 1,0-4,0% de los mismos³⁰. Una vez que estos eventos se han producido, el único tratamiento eficaz es el trasplante hepático. El VHC, es la causa más frecuente de indicación de trasplante hepático en los países desarrollados. Una vez alcanzada la fase final de la historia natural de la infección por VHC, el riesgo de muerte es del 15,0-20,0%¹⁹.

3.- Epidemiología de la infección por el Virus de la Hepatitis C

La infección por el VHC es un problema grave de salud pública a escala global³¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que más de 71 millones de personas

a lo largo del mundo presentan una infección crónica por VHC, lo que representa una prevalencia global del orden del 1,0%. La tasa de nuevas infecciones a nivel mundial en 2015 fue de 1,75 millones de personas³². En Europa, la *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)* ha reportado en el año 2016, 33.860 nuevos casos de VHC en 29 países miembros de la Unión³³. En lo que respecta a la mortalidad derivada de complicaciones hepáticas como la cirrosis o el CHC, la infección por VHC causa, a nivel mundial, la muerte de 399.000 personas al año³².

A pesar de que la infección por VHC es un problema global, la prevalencia de la misma varía sustancialmente a lo largo del mundo. Así, las regiones del norte de África, junto con Oriente Medio, son las zonas más afectadas el virus, con una prevalencia estimada del 2,3%³². A nivel europeo, la prevalencia de personas infectadas por el VHC varía entre los diferentes países, encontrándose las tasa de prevalencia más elevadas (superiores al 2,0%) en los estados del sur (Italia, Rumanía, Grecia y España)³⁴. En el caso de España, se han realizado diversos estudios para evaluar la prevalencia del VHC con resultados muy heterogéneos en función de la región geográfica evaluada y la población seleccionada (0,6%-2,6%)³⁵⁻⁴¹. El Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud (PEAHC), redactado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, cifra una prevalencia del 1,7%⁴². Sin embargo, estudios más recientes de cribado y modelos de estimación matemática han sugerido prevalencias inferiores, con tasas cercanas al 1,0% (1,2-0,4%)^{43,44}.

El VHC es un virus de transmisión sanguínea. La principal vía de transmisión del VHC es parenteral percutánea, siendo el uso de drogas por vía intravenosa (Adictos a Drogas por Vía Parenteral, ADVP) la forma más prevalente de transmisión⁴⁵. Además, el empleo de material hospitalario contaminado (nosocomial) y la transfusión sanguínea o el uso de hemoderivados contaminados, son también vías de transmisión frecuentes^{46,47}. Por su parte, la vía de transmisión sexual afecta principalmente a hombres que tienen sexo con hombres (HSH), aunque no constituye una forma habitual de infección⁴⁸.

La distribución de las vías de transmisión es variable en función del área geográfica evaluada y ha evolucionado a lo largo de la historia de la infección por VHC. La incorporación de programas activos de cribado del VHC en transfusiones sanguíneas y hemoderivados, la implantación de programas de intercambio de jeringuillas, así como la popularización de instrumental médico de un solo uso y la mejora de los sistemas de esterilización, han supuesto un importante avance para el control del

VHC⁴⁹. En este contexto, conocer la prevalencia de la vía de transmisión del VHC, resulta un elemento clave para el desarrollo de programas de cribado en poblaciones de riesgo específicas.

3.1.- Epidemiología molecular del Virus de la Hepatitis C

El VHC, al igual que otros virus de ARN, se caracteriza por presentar una elevada variabilidad genética, incluso más pronunciada que el caso del VIH⁵⁰. Los dos factores principales que explican esta variabilidad son la elevada cinética de replicación viral (alrededor de 10^{12} viriones/día en pacientes con infección crónica) y la alta tasa de mutación, debida a la falta de función correctora de errores de la ARN-polimerasa dependiente de ARN (tasa de error estimada de 10^{-3} a 10^{-5} mutaciones por nt de genoma replicado)^{51,52}.

La elevada variabilidad genética del VHC es un elemento clave en la patogénesis y el tratamiento de la enfermedad. Así, esta alta variabilidad permite: la evasión del sistema inmune y el establecimiento de la infección crónica⁵³, así como la generación de variantes asociadas a resistencia (VAR), que comprometen la eficacia del tratamiento⁵⁴. Por otra parte, la alta diversidad genética del virus ha dificultado el desarrollo de una vacuna profiláctica efectiva⁵⁵.

El VHC se clasifica en función del grado de homología de los genomas virales, en genotipos (homología del 60-70%) y subtipos virales (homología del 78-88%). En la actualidad se han descrito siete genotipos, los cuales se designan con números arábigos y más de 67 subtipos, designados por medio de una letra que acompaña al número que define el genotipo^{56,57}. Además de la variabilidad intergenómica previamente descrita, el VHC presenta variabilidad intragenómica. Este nivel de variabilidad se debe a que dentro de un mismo individuo infectado por el VHC, puede darse una mezcla heterogénea de genomas muy relacionados entre sí pero no idénticos (homología superior al 98%), conocidos bajo el nombre de cuasiespecies virales⁵⁸.

La distribución de los distintos genotipos y subtipos muestra patrones de distribución geográfica complejos, que reflejan las diferencias en su epidemiología, incluyendo las vías de transmisión y la historia de los movimientos poblacionales^{59,60}. A nivel mundial (**Figura 5**) los genotipos virales 1, 2 y 3 y, específicamente, los subtipos 1a, 1b, 2a y 3a, están ampliamente distribuidos y son los causantes de la mayor parte de las infecciones a nivel global a diferencia de los otros genotipos, cuya localización está

limitada a ciertas áreas geográficas⁵⁹. Así, el genotipo 4 es especialmente predominante en el norte de África y Oriente Medio, mientras que los genotipos 5 y 6 son endémicos del sur de África y del Sudeste Asiático, respectivamente poblacionales^{59,60}. Por su parte, el genotipo 7, recientemente identificado, ha sido aislado en inmigrantes centroafricanos en Canadá⁵⁷. En lo que respecta a las vías de transmisión, los subtipos 1b y genotipo 2 han sido asociados tradicionalmente con transfusiones sanguíneas y prácticas médicas no seguras; mientras que el subtipo 1a y los genotipos 3 y 4 se han asociado principalmente a ADVP^{49,61}.

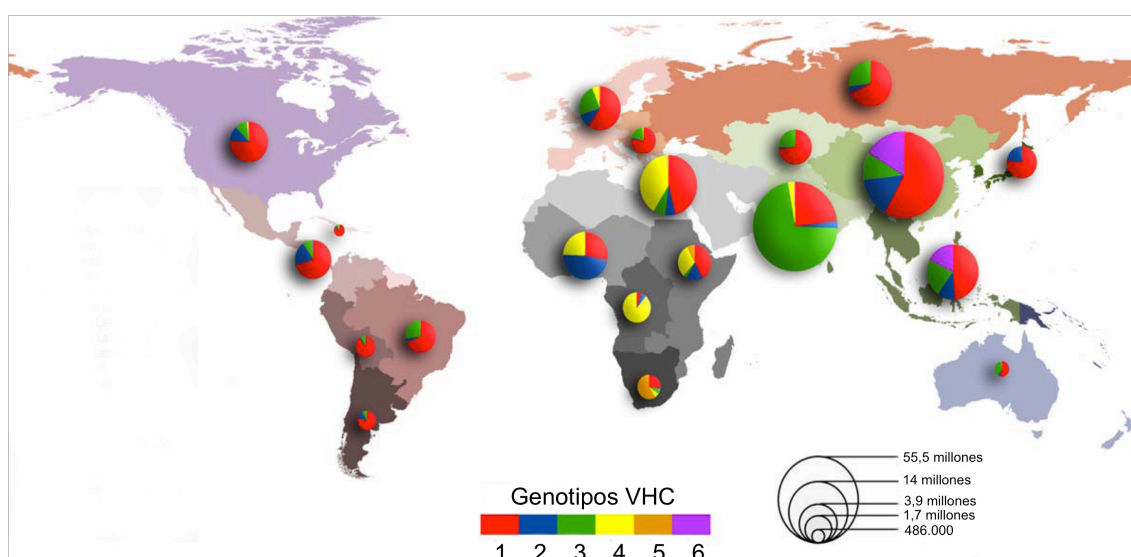


Figura 5. Distribución mundial de los genotipos del Virus de la Hepatitis C. Adaptada de Messina y colaboradores⁵⁹. VHC: Virus de la Hepatitis C.

En el caso de España, la distribución de los genotipos ha sido recientemente actualizada mediante el estudio GEHEP 005; un estudio multicéntrico que analiza la distribución de los genotipos y subtipos virales en España, en más de 45.000 pacientes en el periodo 2000-2015⁶². Este estudio ha identificado al genotipo 1 (66,9%) y, concretamente, el subtipo 1b (37,9%), como los más prevalentes en España, seguidos de los genotipos 3 (17,3%) y 4 (11,4%). Además, se ha observado una distribución variable de los mismos en función de la región analizada, así como una tendencia temporal de cambio en la distribución los mismos con respecto a los registros previos^{62,63}.

La determinación del genotipo y subtipo viral ha sido un clave durante los tratamientos basados en interferón (IFN), así como en los primeros fármacos antivirales de acción directa (AADs), al guiar no solo la duración, sino también la combinación utilizada y su tasa de respuesta. Sin embargo, el reciente lanzamiento de los nuevos fármacos

pangenotípicos, ha puesto en duda la utilidad de la determinación del genotipo y subtipo viral. A pesar de ello, la determinación del genotipo y subtipo viral continúa siendo una herramienta de gran utilidad para la vigilancia epidemiológica de la infección por VHC, ya que cambios en la distribución de los genotipos pueden ser un indicador de cambios en las vías de transmisión o reflejar movimientos migratorios con un impacto importante en la gestión y manejo de la infección por VHC ^{49,59,64}.

4.- Fibrosis Hepática

4.1.- Fisiopatología de la fibrosis hepática

A pesar de que el VHC no se considera citopático por sí mismo, el principal efecto patogénico de la infección crónica es la generación de fibrosis hepática, la cual se va acumulando en el hígado hasta convertirse en cirrosis durante el estadio terminal de la enfermedad. La fibrosis produce una pérdida de la arquitectura del tejido hepático, así como de su elasticidad y funcionalidad⁶⁵. De este modo, la fibrosis contribuye a aumentar la resistencia al flujo sanguíneo intrahepático y generar hipertensión portal, así como a dificultar el intercambio de nutrientes y metabolitos entre el flujo de sangre del espacio sinusoidal y los hepatocitos (capilarización de los sinusoides)⁶⁶.

La fibrosis hepática puede ser definida como una respuesta dinámica de cicatrización en el tejido hepático, caracterizada por un desequilibrio en la síntesis-degradación de la matriz extracelular (MEC) en el espacio de *Disse* y la subsecuente acumulación de MEC, tras un daño hepático prolongado. El fenómeno de fibrosis hepática se produce por la activación y transformación, tras un daño hepático, de las células estrelladas hepáticas (CEH) en células similares a miofibroblastos. Las CEH son una población de células mesenquimales localizadas en el espacio de *Disse*, en contacto directo con los hepatocitos y las células endoteliales fenestradas, cuya función, en estado de quiescencia, es el almacenamiento de retinoides (principalmente vitamina A)⁶⁷. La activación de las CEH, produce profundos cambios morfológicos y funcionales, convirtiéndose en células con una alta capacidad proliferativa, quimiotáctica, contráctil y fibrogénica (producción de MEC). Además, se ha descrito que las CEH activadas son capaces de producir grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, que ayudan a mantener el estado activado de las células y contribuyen a la progresión de la fibrosis⁶⁵.

Tradicionalmente, el proceso de activación de las CEH ha sido descrito en dos fases: iniciación y perpetuación⁶⁸. La fase de iniciación, también conocida como estado pre-inflamatorio, se refiere a los cambios tempranos ocurridos en la expresión génica y en

el fenotipo de las CEH y es el resultado de la estimulación paracrina de células dañadas. Dentro del grupo de células que pueden actuar como activadores de las CEH, se han descrito diversos tipos de celulares tales como: células de Kupffer activadas, hepatocitos dañados, células endoteliales, plaquetas o los propios miofibroblastos. En lo que respecta a las señales paracrinas, se han descrito un gran número de citoquinas y factores que pueden actuar como activadores de las CEH, como por ejemplo el factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor- β , TGF- β*), el factor de crecimiento transformante α (*transforming growth factor- α , TGF- α*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor, PDGF*), especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species, ROS*)⁶⁵. La fase de perpetuación se produce debido al mantenimiento de los estímulos anteriormente indicados y se caracteriza por, al menos, seis cambios en el comportamiento de las CEH. Dentro de estos cambios destacan: un aumento de la proliferación celular; una capacidad quimiotáctica o migratoria de los miofibroblastos hacia lugares con daño hepatocelular; la pérdida del contenido en retinoides; la adquisición de capacidad contráctil y la liberación autocrina y paracrina de citoquinas pro-inflamatorias. Además, durante esta fase, las CEH activadas secretan altas cantidades de MEC, principalmente colágeno de tipo I, colágeno de tipo III y fibronectina, al área subendotelial del espacio de *Disse*, produciendo MEC de tipo cicatricial y la consiguiente formación de septos fibróticos. En la fase de perpeturación, se ha descrito también una alteración del balance de las metaloproteinasas (matrixinas), debido a la producción por parte de las CEH activadas de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (*tissular inhibitors of metalloproteinases, TIMS*), que impiden la degradación de la nueva MEC secretada^{65,69}.

En el caso de la infección por VHC, el proceso de fibrosis parece estar desencadenado por las propias proteínas virales que pueden activar de un modo directo las CEH o inducir, en células del microambiente hepático, señales pro-fibrogénicas o de activación de las CEH. Además, se ha descrito que la respuesta inmune desencadenada por el virus promueve el mantenimiento del proceso de fibrosis por medio de la activación de vías inflamatorias⁷⁰.

Estudios realizados en la última década han sugerido la posibilidad de una tercera fase dentro del proceso de fibrosis, denominada resolución. Este estadio consistiría en la posibilidad de reducir o revertir el estado de activación de las CEH y, con ello, reducir el grado de fibrosis hepática al suprimirse el estímulo causante de la activación^{71,72}. Actualmente existen evidencias de un posible aclaramiento de las

células activadas por medio de mecanismos apoptóticos o de senescencia⁶⁵. Estos hallazgos, junto con la mejora en el conocimiento del proceso fisiopatológico y molecular de la fibrosis hepática, se presentan como una herramienta prometedora para el desarrollo de terapias antifibróticas funcionales⁷³.

4.2.- Evaluación y monitorización de la fibrosis hepática

De forma clásica, la técnica diagnóstica de elección o *gold standard* para la evaluación de la fibrosis hepática se basaba en la biopsia hepática. Esta técnica consiste en la toma de una pequeña muestra de tejido hepático por medio de una punción percutánea, seguida de una valoración histopatológica y neuroinflamatoria del tejido en base a una escala estandarizada⁷⁴. Actualmente existen diversos sistemas estandarizados para la evaluación de la fibrosis hepática, como las escalas METAVIR e Ishak^{75,76}. En el caso de la infección por VHC, el principal sistema estandarizado empleado para la evaluación de la fibrosis hepática es el denominado METAVIR (*METAVIR scoring system*), el cual gradúa la fibrosis en cinco estadios: F0, F1, F2, F3 y F4, siendo F0 ausencia de fibrosis y F4 un estadio de cirrosis⁷⁶. Estudios recientes apuntan a la posibilidad de modificar las anteriores escalas y dividir el estadio de fibrosis F4, en diferentes grados (baja, moderada y severa), con el fin de mejorar la clasificación de la misma (escala Laennec)⁷⁷.

A pesar de la gran cantidad de información aportada por la biopsia hepática (fibrosis, inflamación, necrosis, esteatosis), el carácter invasivo de la técnica junto con las posibles complicaciones derivadas de la misma, la subjetividad a la hora de su evaluación y la incompatibilidad de un seguimiento continuado del paciente, han hecho que, en la última década, se desarrollen métodos no invasivos para el análisis de la fibrosis hepática⁷⁸. Los métodos no invasivos utilizados para analizar el estadio de fibrosis hepática se caracterizan por ser reproducibles, carecer de contraindicaciones, tener un uso sencillo y por presentar una alta especificidad y sensibilidad. Además, sus resultados pueden combinarse, mejorando así la capacidad diagnóstica de los mismos y posibilitando la realización de un seguimiento de la evolución del grado de fibrosis de los pacientes.

Los métodos no invasivos actuales pueden ser clasificados en: (i) paneles serológicos y bioquímicos, los cuales cuantifican moléculas implicadas de forma directa o indirecta en el proceso de la fibrosis hepática; (ii) algoritmos que combinan parámetros serológicos y datos clínicos del paciente y (iii) pruebas basadas en el uso de

tecnologías de imagen y sonido⁷⁹. En la **Tabla I** se recogen los principales métodos no invasivos empleados en la actualidad.

Tabla I. Principales métodos no invasivos empleados en la actualidad para la evaluación de la fibrosis hepática.

| Marcadores serológicos de fibrosis | | | |
|------------------------------------|-----------------------|------------------|---|
| Directos | Indirectos | Algoritmos | Pruebas basadas en: tecnologías de imagen y sonido |
| Laminina | AST | APRI | Ultrasonografía |
| AH | ALT | FIB-4 | Tomografía computerizada |
| P3 | GGT | <i>Fibrotest</i> | Resonancia magnética |
| MMP-1,MMP-2 | Recuento de plaquetas | SAFE | ET |
| TIMPs | Albúmina | <i>Biopsy</i> | |
| | TP | <i>Hepascore</i> | |

AH: ácido hialurónico; ALT:alaninotransferasa; AST:aspartato aminotransferasa; ET: elastografía de transición; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; *MMP-1: Matrix metaloproteinase-1*; *MMP-2: Matrix metaloproteinase-2*; *P3: Pro-collagen type3*; *SAFE: Sequential Algorithm for Fibrosis Evaluation*; *TIMPs: tissular inhibitors of metalloproteinases*; TP: tiempo de protrombina.

Dentro de los métodos no invasivos, uno de los más utilizados para la evaluación de fibrosis hepática durante la infección por VHC es la elastografía de transición (ET). La tecnología ET, comercializada bajo el nombre de *FibroScan (Echosens, Francia)*, se basa en la determinación de la rigidez del hígado (dureza hepática) por medio de pulsos ultrasónicos, en un proceso similar al que ocurre en una ecografía. El valor obtenido de elasticidad, se expresa en kilopascales (kPa), y varía desde los 2,5 kPa en pacientes sanos a 75 kPa en pacientes cirróticos⁸⁰.

Las actuales guías de tratamiento, recogen en sus indicaciones, en lugar de la biopsia, el uso y combinación de pruebas no invasivas para la evaluación de la fibrosis hepática. Dentro de estas pruebas, las guías destacan la utilización del test APRI [cociente aspartato aminotransferasa (AST) y recuento de plaquetas], el algoritmo FIB-4 [tiene en cuenta la edad, el recuento de plaquetas y los niveles de AST y alaninotransferasa (ALT)] y la ET^{81,82}. Además de lo indicado, la guía de la *European Association for the Study of the Liver (EASL)* continúa recomendando la biopsia hepática en caso de sospecha de otras etiologías, como síndrome metabólico o alcoholismo.

La detección, cuantificación y monitorización de la fibrosis hepática resulta un elemento clave para llevar a cabo la toma adecuada de decisiones relacionadas con el manejo clínico de la infección por VHC. Además, hasta el año 2016, la fibrosis

hepática fue considerado un marcador para la priorización del tratamiento frente al VHC. Así, la guía del *EASL* de 2016 o el *PEAHC*, recogían que debía priorizarse el tratamiento antiviral a pacientes con un grado de fibrosis avanzada (F2-F4)^{42,83}. No obstante, estas recomendaciones han sido modificadas y actualmente se recomienda el inicio de tratamiento independientemente del grado de fibrosis del paciente^{81,84}.

En lo que respecta a la monitorización de la fibrosis, tanto la guía de la *American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)* como la de la *EASL*, en sus últimas actualizaciones, recomiendan conocer el grado de severidad de la enfermedad hepática previo al inicio del tratamiento y, una vez se haya alcanzado la respuesta viral sostenida RVS, continuar con la monitorización cada 6 meses y de manera indefinida en aquellos pacientes con grados de fibrosis avanzada (F3) o cirrosis (F4), debido a su alto riesgo de progresión a CHC. Por su parte, en el grupo de pacientes con fibrosis baja o moderada (F0-F2) y ausencia de factores de riesgo o comorbilidades asociadas a la fibrosis hepática, las guías no recomiendan realizar un seguimiento de los mismos una vez alcanzada la RVS. Finalmente y debido a la falta de datos concluyentes, cabe destacar que las guías no recomiendan realizar el seguimiento post-tratamiento mediante métodos no invasivos^{81,82}.

4.3.- Factores implicados en la fibrosis hepática

La fibrosis hepática es un proceso dinámico, no lineal, que parece estar influido por factores del huésped y del virus. En la **Tabla II** se recogen los principales factores descritos en la literatura implicados en la evolución de la fibrosis hepática.

Tabla II. Principales factores implicados en la fibrosis hepática.

| Factores del huésped | | |
|------------------------------|-------------------------|--------------------|
| Modificables | No modificables | Factores virales |
| Consumo activo de alcohol | Sexo masculino | Co-infección VIH |
| Consumo de tabaco y cannabis | Raza negra | Co-infección VHB |
| Obesidad | Edad >40 años | Genotipo 3 del VHC |
| Síndrome metabólico | momento infección | |
| Esteatosis hepática | Diabetes | |
| | Polimorfismos genéticos | |

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; VHB: Virus de la Hepatitis B; VHC: Virus de la Hepatitis C.

Entre los principales factores del huésped se ha identificado edades superiores a 40 años en el momento de la infección por VHC, el sexo masculino y el consumo activo de alcohol como factores de peor pronóstico en la progresión de la fibrosis⁸⁵⁻⁸⁸. La obesidad, resistencia a la insulina, diabetes, síndrome metabólico o la presencia de

esteatosis hepática han sido también identificados como factores de progresión de la enfermedad⁸⁹⁻⁹³. Además, el consumo de tabaco y cannabis⁹⁴, el perfil racial del paciente (raza negra)⁹⁵, el estado inmune del mismo y el tiempo con infección activa por VHC, parecen tener también un impacto en la fibrosis. En lo referente a las co-infecciones con otros virus, se han descrito como moduladores de peor pronóstico la co-infección con el VIH o el VHB^{90,96,97}. Por otra parte, dentro de los factores del huésped, se han identificado polimorfismos genéticos con alto impacto en la progresión de la fibrosis hepática. La presencia de polimorfismos y su impacto en la fibrosis hepática, se detalla con más profundidad en el apartado 6 de la Introducción.

En relación a los factores del virus, la presencia del genotipo 3, ha sido identificada como único elemento viral de riesgo en el desarrollo de fibrosis hepática^{98,99} al inducir mayores niveles de esteatosis. A pesar de estas evidencias, todavía no han sido identificadas las bases moleculares que subyacen a las mismas.

Finalmente, cabe destacar que el conocimiento de los factores implicados en la progresión de la fibrosis hepática, resulta un elemento clave en la identificación y manejo de poblaciones con alto riesgo de progresión hacia estadios avanzados de la enfermedad, en las que el seguimiento clínico debe ser más estricto y continuado. Además, la identificación de factores de peor pronóstico modificables, tales como la obesidad, la presencia de síndrome metabólico o el consumo activo de alcohol, tabaco o cannabis, ha posibilitado el desarrollo de programas de concienciación y prevención de estos hábitos ante la infección por VHC.

5.- Tratamiento frente al Virus de la Hepatitis C

El tratamiento frente al VHC se basa en el uso de fármacos que inhiben de una forma activa la replicación viral. El hecho de que el VHC presente un ciclo viral no integrativo, hace posible la erradicación completa de la infección. En este contexto, el objetivo del tratamiento frente al VHC es alcanzar la RVS, definida ésta como niveles del ARN-VHC indetectables tras 12 ó 24 semanas desde el fin del tratamiento (RVS₁₂ y RVS₂₄, respectivamente). La evaluación de la RVS₁₂ y RVS₂₄, ha sido aceptada tanto en Europa como en Estados Unidos (EEUU) y presenta una concordancia en más del 99% de los casos^{81,82}.

En lo que respecta a la historia del tratamiento del VHC ésta ha variado sustancialmente a lo largo de los años. Así, durante veinticinco años (1986-2011), el tratamiento frente al VHC se basó en el uso de IFN o interferón pegilado (pegIFN),

primero en forma de monoterapia y, después, combinado con ribavirina (RBV)¹⁰⁰⁻¹⁰². El empleo del IFN o pegIFN, ambos de la familia de IFN tipo I, se basa en la actividad antiviral de este compuesto que, pese a no actuar directamente sobre el virus o su replicación, es capaz de inducir la expresión de genes sensibles a interferón (*IFN-stimulated genes, ISGs*) y crear así un estado antiviral en el interior de la célula. Por su parte, la RBV, un análogo de guanosina, ha sido descrito como un potente antiviral frente a virus de ARN, al inhibir o alterar pasos clave durante la replicación, así como al contribuir a la modulación del sistema inmune¹⁰³.

Las terapias basadas en el uso de IFN o en el uso combinado de IFN y RBV, presentaban una tasa de RVS del 35.0-86.0%, con resultados variables en función de las características virológicas y del huésped. Además de esta baja tasa de respuesta, este tipo de combinaciones, presentaban numerosos efectos adversos, requerían de inyecciones semanales y su uso estaba contraindicado en ciertas poblaciones de pacientes^{102,104,105}.

La mejora en el conocimiento del ciclo viral¹⁴, así como el estudio de la función y estructura de ciertas proteínas virales⁵ ha permitido que, desde el año 2011, el tratamiento del VHC se base en la utilización de moléculas que inhiben de una forma selectiva proteínas virales fundamentales en el ciclo replicativo del virus: NS3/4A (proteasa viral), NS5A y NS5B (polimerasa dependiente de ARN viral). Estas moléculas, conocidas como AADs han permitido: (i) mejorar las tasas de RVS, con tasas superiores al 90% en la mayor parte de los casos; (ii) reducir el tiempo de tratamiento; (iii) mejorar la tolerabilidad y (iv) poseer una posología más sencilla, con regímenes basados en el uso de una o dos pastillas orales diarias¹⁰⁶.

Desde el lanzamiento en el año 2011 de los primeros inhibidores de la proteasa, boceprevir y telaprevir, basados en su uso combinado con pegIFN+RBV, se ha producido un incremento en el arsenal terapéutico frente al VHC. Así, a partir del año 2013, se disponen de tratamientos basados únicamente en el uso simultáneo y co-formulado de varios AADs, que bloquean de forma selectiva dos o tres dianas del ciclo replicativo del virus (terapias libres de IFN o *IFN-free therapies*). Además de esto, el desarrollo de los inhibidores de segunda y tercera generación han mejorado la eficacia y potencia, así como su perfil de seguridad y posología, incluso en poblaciones de pacientes tradicionalmente definidas como “difíciles de tratar” (genotipo 3, cirróticos, co-infectados con VIH y pretratados frente al VHC)¹⁰⁶. Por otro lado, en este contexto de mejora, en el año 2017 y 2018, se han lanzado al mercado tratamientos pangenotípicos, que permiten su uso terapéutico con independencia del genotipo del

VHC, simplificando así el tratamiento y reduciendo los costes derivados de la determinación del genotipo viral¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

En la actualidad se dispone de un total de 13 AADs aprobados por la *Food and Drug Administration (FDA)* y por la *European Medicines Agency (EMA)* para el tratamiento del VHC^{110,111}. En la **Tabla III**, se recogen los principales AADs disponibles para el tratamiento del VHC, en función de la diana terapéutica de los mismos.

Tabla III. Antivirales de Acción Directa disponibles actualmente para el tratamiento de la Hepatitis C de acuerdo a su diana terapéutica.

| Inhibidores de NS3/4A | Inhibidores de NS5A | Inhibidores de NS5B |
|---|--|-------------------------|
| Glecaprevir Voxilaprevir Grazoprevir Paritaprevir Simeprevir | Daclatasvir Velpatasvir Ledipasvir Ombitasvir Pibrentasvir Elbasvir | Sofosbuvir Dasabuvir |

En negrita se recogen los fármacos pangenotípicos. NS3/4A: proteasa viral; NS5A: fosfoproteína NS5A; NS5B: ARN-polimerasa dependiente de ARN.

En lo que respecta al acceso al tratamiento, a pesar de la reducción de su coste derivada del aumento del número de moléculas disponibles, así como del lanzamiento de combinaciones genéricas, éste continua siendo bajo. Así, a nivel global, se estima que, en el año 2015, tan sólo el 7,0% de los pacientes diagnosticados es mismo año iniciaron tratamiento frente al VHC. Además, dentro del grupo de pacientes tratados, solamente la mitad lo hizo con regimenes basados en AADs⁴⁵. En el caso de España, el informe de octubre de 2018 del PEAHC, establece que en el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2015 y el 30 de septiembre de 2018, un total de 117.452 pacientes iniciaron tratamiento basado en AADs¹¹².

5.1.- Duración y monitorización del tratamiento: dinámica viral

La duración del tratamiento frente al VHC está determinado en base a la combinación de factores virales (genotipo y subtipo viral), del huésped (grado de la enfermedad hepática o la exposición previa a tratamiento frente al VHC) y del propio régimen de tratamiento seleccionado^{81,82}.

En lo que respecta al tiempo de tratamiento, las terapias actuales basadas en el uso de AADs, han permitido reducir de forma considerable la duración de los mismos hasta las 8-24 semanas, dependiendo de la combinación y características del paciente^{81,82} (la duración estándar de los tratamientos basados en pegIFN+RBV era de

24-48 semanas). En este nuevo escenario terapéutico y con el fin de maximizar el balance coste-eficacia además de la tolerabilidad de las nuevas terapias, estudios recientes han evaluado la posibilidad de minimizar la duración de los tratamientos hasta 3-6 semanas¹¹³⁻¹¹⁷. Sin embargo, las actuales guías terapéuticas no recomiendan la realización de terapias con duraciones inferiores a 8 semanas^{81,82} debido al escaso número de estudios disponibles hasta el momento, la población analizada (poblaciones definidas como “fáciles de tratar”: genotipo 1, no cirróticos y *naïve* a tratamiento frente al VHC) y la falta de resultados concluyentes.

En lo que respecta a la monitorización del tratamiento frente al VHC, ésta se basa en la cuantificación de los niveles ARN-VHC (carga viral) presentes en plasma en diversos puntos del tratamiento (dinámica viral). La utilidad de la dinámica viral en la monitorización del tratamiento ha evolucionado de forma paralela al desarrollo de nuevos fármacos y combinaciones.

Durante los de tratamiento basados en el uso de IFN, la evaluación de la dinámica viral fue utilizada como una herramienta para la personalización de la duración de las terapias. Así, la dinámica viral, proporcionaba la base para el establecimiento de reglas de parada del tratamiento y permitía optimizar el balance coste-eficacia, además de reducir los efectos adversos. En este contexto, se identificó que cargas virales indetectables, o un descenso de al menos 2 logaritmos UI/mL tras 12 semanas de tratamiento, presentaban un fuerte valor predictivo positivo de RVS^{118,119}. La evaluación de la carga viral a semana 12 en tratamientos basados en IFN, fue establecida como una regla de parada del tratamiento¹²⁰.

La llegada de los AADs y los regímenes libres de IFN, supuso un cambio en la monitorización del tratamiento, eliminando las reglas de parada establecidas hasta el momento y reduciendo la utilidad de la cuantificación de la carga viral del VHC durante el tratamiento. En el actual contexto terapéutico, la guía de tratamiento de la *EASL* recoge, en su última actualización de 2018, que la determinación de la carga viral ha de realizarse previa al inicio del tratamiento (basal) y tras 12-24 semanas una vez finalizado el mismo [(RVS₁₂ y RVS₂₄)]⁸¹. Por su parte, la guía elaborada por *AASLD*, en su versión del año 2018, presenta las mismas recomendaciones que la guía del *EASL* y añaden la posibilidad, a modo informativo, de evaluar la carga viral a semana 4, para conocer respuesta inicial y adherencia, y al finalizar el tratamiento para determinar, en caso de que se produjese, el tipo de fracaso⁸². Además, la guía del *AASLD*, apunta que calores positivos de carga viral en semana 4 no deben guiar una parada del tratamiento y tan sólo incrementos en la carga viral superiores a 1 log UI/mL en

subsecuentes determinaciones pueden ser considerados como elementos para suspender la terapia⁸².

A pesar de lo indicado por las principales guías terapéuticas, ciertos estudios han re-evaluado la posible utilidad de la cuantificación de la carga viral en la respuesta predictiva a los tratamientos basados en AADs, buscando nuevas reglas de parada que permitan optimizar y personalizar las actuales terapias^{111,117,121-124}. A pesar de los prometedores resultados obtenidos, es necesaria la validación y extensión de los mismos a otras cohortes de pacientes, con el fin de poder establecer reglas de parada eficaces e universales en la práctica clínica diaria¹²⁵.

5.2.- Impacto del tratamiento en la enfermedad hepática

El impacto positivo del tratamiento antiviral y de la adquisición de RVS en la evolución de enfermedad hepática ha sido ampliamente demostrada. En este contexto, numerosos estudios han reportado: una mejora en la funcionalidad del hígado, una disminución de la inflamación y de la incidencia de manifestaciones extrahepáticas^{126,127}, así como una reducción significativa del riesgo CHC, muerte relacionada con eventos hepáticos y de trasplante hepático^{128,129}.

En lo que respecta a la fibrosis hepática, una gran cantidad de estudios llevados a cabo tanto en terapias basadas en IFN como en AADs, apuntan a un descenso de la progresión de la misma, e incluso, a una regresión tras la erradicación permanente de la replicación. La regresión de la fibrosis hepática puede ser explicada por un proceso bifásico: una primera fase rápida marcada por la reducción de la inflamación hepática, derivada de la eliminación de la replicación viral y una segunda fase, más lenta, caracterizada por una atenuación del proceso de fibrogénesis. Además, la regresión de la fibrosis parece ser más marcada y rápida en pacientes con estadios avanzados (F3-F4) y niveles altos de inflamación hepática previo al inicio del tratamiento¹³⁰.

A pesar de las evidencias alcanzadas hasta el momento, todavía se requieren más estudios que combinen distintas metodologías de evaluación de la fibrosis hepática y presenten tiempos de seguimiento mayores, con el fin de mejorar el conocimiento en este campo, así como para identificar posibles poblaciones diana en los que el seguimiento de la fibrosis debe ser más estricto.

6.- Factores genéticos implicados en la infección por el Virus de la Hepatitis C: haplogrupos de ADN mitocondrial

Tal y como ya se ha comentando en apartados anteriores, el curso clínico de la infección por VHC, incluyendo: el aclaramiento espontáneo de la misma durante su fase aguda, los diferentes niveles de respuesta al tratamiento, así como la progresión de la fibrosis hepática y el desarrollo de cirrosis y CHC, presenta una alta variabilidad inter-individual. En este sentido, se ha sugerido que ciertos factores genéticos, pueden jugar un papel clave, tanto en la persistencia de la infección como en la progresión de la misma¹³¹⁻¹³⁵.

La mejora de las tecnologías de análisis genético, así como el desarrollo de nuevas estrategias moleculares, han permitido en las dos últimas décadas aumentar el conocimiento sobre el impacto de las bases genéticas del huésped en el curso clínico de la infección por VHC. Así, desde su lanzamiento en 1996, los estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide association Studies*, GWAS), han identificado cientos de variantes genéticas, definidas como polimorfismos de base sencilla (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), implicadas en diferentes aspectos de la infección por VHC^{136,137}. Esta técnica, se basa en la búsqueda de una asociación entre un carácter a estudio y cientos de miles de SNPs localizados a lo largo del genoma humano, por medio de la identificación de cambios en la distribución de la frecuencia alélicas de los mismos. Una de las principales ventajas de los GWAS, es que no sólo permiten la detección de SNPs relacionados con una característica; sino que también ayudan a mejorar el conocimiento de la fisiopatología de dicha característica, mediante la identificación de aquellos genes implicados en la misma¹³⁸. Además, la creciente mejora del conocimiento de las bases moleculares relacionadas con la patogénesis de la infección por VHC, sumada al desarrollo de las tecnologías basadas en la secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*, NGS) como el análisis transcriptómico mediante *RNA sequencing*, (*RNA-seq*) o *chips* de ARN (*microarrays*) o los análisis del perfil de epigenético del genoma, han permitido incrementar el número de genes y SNPs con un papel clave en la infección por VHC¹³⁹⁻¹⁴⁴.

En la actualidad, cientos de SNPs, localizados principalmente en genes relacionados con la regulación de la respuesta inmune y el proceso de fibrogénesis, han sido identificados como variantes con gran impacto en la respuesta al tratamiento frente al VHC, el aclaramiento espontáneo de la infección, así como en la progresión de la fibrosis hepática y el desarrollo de CHC¹³¹⁻¹³⁵. Dentro de los SNPs con mayor impacto

en la infección por VHC destaca, debido a su alta capacidad predictiva de la RVS en terapias basadas en pegIFN, así como en el aclaramiento espontáneo de la infección por VHC, el *SNP* rs12979860 del promotor del gen de la IL28B¹⁴⁵. Así, la variante CC de dicho *SNP* se ha asociado, en pacientes con genotipo 1, con mayores tasas de RVS^{146,147}. Por su parte, en lo que respecta al daño hepático, cabe destacar el *cirrhosis risk score* (CRS), una combinación de 7 *SNPs* localizados en los genes AZIN1, TLR4, TRPM5 y AQ2, que permite discriminar aquellos pacientes con un mayor riesgo de progresión fibrosis hacia cirrosis hepática^{148,149}. Otro *SNP*, con resultados prometedores en el campo del daño hepático, ha sido el *SNP* rs738409, del gen de la *patatin-like phospholipase-3* (PNPLA3) al asociarse, su variante GG, con un mayor riesgo de esteatosis y fibrosis hepática^{150,151}.

La identificación de factores genéticos implicados en el curso clínico de la infección por VHC ha sido propuesta como una herramienta de gran utilidad en la identificación de poblaciones con mayor riesgo, además de abrir el camino hacia un manejo terapéutico personalizado en función de las características del paciente. Sin embargo, y pese a los prometedores resultados obtenidos hasta el momento, continua habiendo cierta incertidumbre en cuanto a su aplicación en la práctica clínica diaria debido a la existencia de resultados dispares en función de las características de la cohorte analizada. En este contexto, se requiere la realización de futuros estudios de validación en amplias cohortes de pacientes, así como la identificación de posibles factores confusores implicados en las asociaciones¹⁵².

6.1.- Haplogrupos de ADN mitocondrial e infección por el Virus de la Hepatitis C

Los haplogrupos mitocondriales o haplogrupos de ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (ADNmt) son grupos poblacionales definidos por la presencia de un conjunto, estable y característico, *SNPs* a nivel del ADNmt, derivados de la alta tasa de mutación del ADNmt, como una respuesta adaptativa a las diferentes condiciones geográficas y ambientales experimentadas a lo largo de los flujos migratorios de las poblaciones humanas¹⁵³.

La relación existente entre los haplogrupos de ADNmt y el proceso migratorio de la raza humana, hace que éstos estén asociados geográficamente con una región o zona en particular. Así, al representar la distribución de los haplogrupos a nivel mundial, nos encontramos con que las principales ramas del árbol filogenético poseen una asociación con los diferentes continentes (**Figura 6**). El conjunto de los haplogrupos

mitocondriales puede ser clasificado en tres ramas principales: la rama perteneciente a África subsahariana, que constituiría el antecesor de todos los haplogrupos; la rama del este de Asia, derivada de la rama Africana hace 60.000 años y la rama de la población de origen Europeo o Caucásico, derivada de la africana hace 45.000 años y constituida por los haplogrupos H, V, U, T, J, K, W, X e I^{153,154}.

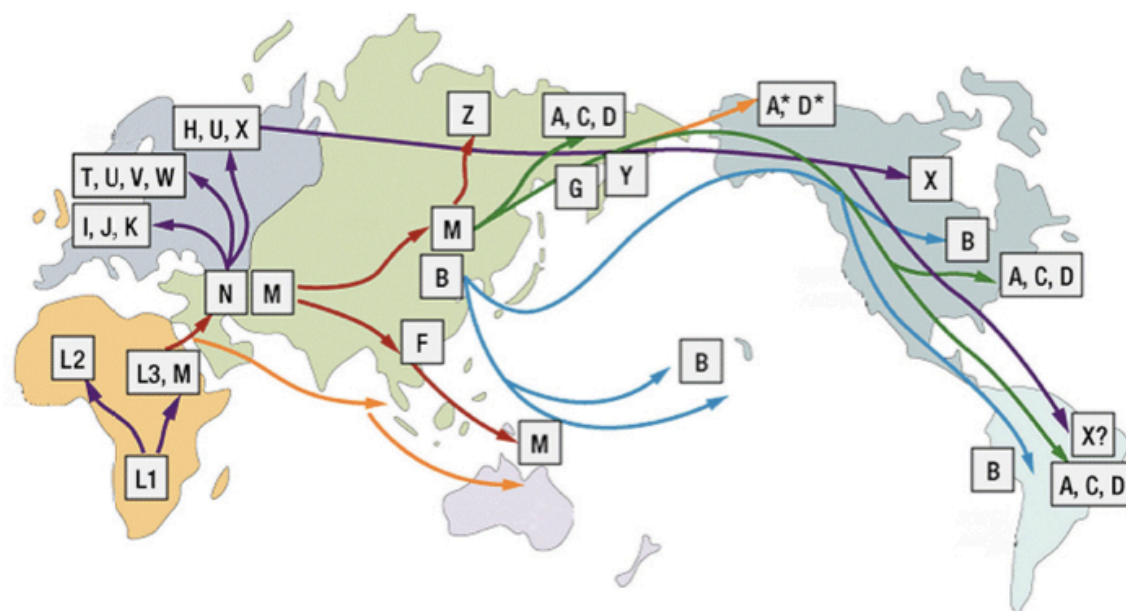


Figura 6. Mapa de la distribución global de los haplogrupos de ADN mitocondrial y sus relaciones filogenéticas. Adaptada de <https://www.familytreedna.com/>

Las características metabólicas particulares de cada uno de los haplogrupos mitocondriales [producción de adenosín trifosfato (*ATP*), *ROS*, generación de calor y apoptosis] y la implicación de la mitocondria en múltiples patologías, tales como la infección por VHC, han motivado el estudio de la relación éstos con diversos tipos de patologías tales como: neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL)¹⁵⁵, Parkinson¹⁵⁶, Alzheimer¹⁵⁷, esclerosis múltiple¹⁵⁸, enfermedades cardiovasculares¹⁵⁹, diabetes mellitus tipo II¹⁶⁰, artrosis de rodilla y cadera^{161,162} y obesidad¹⁶³. A nivel de la infección por VIH¹⁶⁴, los haplogrupos de ADNmt se han relacionado con la progresión de la enfermedad [progresión a Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)¹⁶⁵ y recuperación de los niveles de linfocitos T CD4+¹⁶⁶ y con diversas patologías derivadas del TAR [lipoatrofía¹⁶⁷, resistencia a la insulina¹⁶⁸, dislipemia¹⁶⁹, neuropatía periférica¹⁶⁹].

Además de lo indicado, los haplogrupos de ADNmt han sido asociados en población general con el envejecimiento y la longevidad¹⁷⁰ y han sido utilizados como herramientas para la investigación de la evolución y origen del ser humano¹⁷¹.

En relación al impacto de los haplogrupos de ADNmt a nivel de la infección por VHC, pocos son los estudios que han sido publicados hasta el momento^{172,173}. Así, el estudio llevado a cabo por García-Álvarez y colaboradores, en una cohorte de 231 pacientes co-infectados VIH-VHC, identificó una relación entre los haplogrupos de ADNmt y el grado de fibrosis hepática¹⁷². Por su parte, Guzmán-Fulgencio y colaboradores, en una cohorte española de 304 pacientes co-infectados VIH-VHC bajo tratamiento con pegIFN+RBV, no encontraron ninguna asociación entre los haplogrupos de ADNmt y la respuesta a dicho tratamiento¹⁷³.

La escasez de resultados publicados en el campo de los haplogrupos de ADNmt y el VHC y el potencial uso de los mismos como marcadores genéticos del huésped, predictores de la progresión de la infección por VHC, hacen que se requieran nuevos estudios para profundizar su impacto en la infección por VHC.

7.- Cribado del Virus de la Hepatitis C

La Agenda 2030 para un Desarrollo Sostenible, firmada por la Asamblea General de las Naciones Unidas en octubre de 2015¹⁷⁴, la OMS y su programa *Global Health Sector Strategy (GHSS)* en hepatitis virales, tiene como meta la eliminación de las hepatitis virales en el año 2030, lo que supondría una reducción de la incidencia del VHC del 80,0%⁴⁵. Sin embargo, para alcanzar estos propósitos resulta indispensable identificar todas aquellas infecciones por VHC que todavía no han sido diagnosticadas.

La OMS estima que de los 71 millones de personas con infección crónica por VHC en el mundo, tan sólo el 20,0% conoce su infección⁴⁵. Estas cifras son similares a las reportadas por estudios llevados a cabo en Europa y Norteamérica, en donde se estima que tan sólo están diagnosticados entre el 24,0-50,0% de los pacientes¹⁷⁵⁻¹⁷⁹ y subestimarían la tasa de diagnóstico en países en vías de desarrollo, donde tan solo el 5,0% de los infectados conocería su infección¹⁸⁰. Teniendo esto en consideración, para alcanzar los objetivos fijados por la *GHSS*, se requiere la realización de programas de cribado activos, que permitan la identificación de aquellas personas infectadas. El diagnóstico de la infección supone no sólo un beneficio desde el punto de vista individual (acceso precoz al sistema sanitario y reducción de la morbilidad), sino también para el sistema de salud pública, al reducirse el riesgo de transmisión^{112,178}.

Tradicionalmente, las estrategias de cribado de la infección por VHC, se han centrado en aquellas poblaciones con factores de riesgo tales como: ADVP; pacientes que han

recibido transfusiones o hemoderivados previos a su cribado en 1990; pacientes sometidos a hemodiálisis; HSH; pacientes infectados por VIH, VHB o tuberculosis; hijos de madres VHC positivas; pacientes con niveles elevados de enzimas hepáticas, o personas internas en instituciones penitenciarias.

A pesar de que las estrategias de cribado basadas en factores de riesgo han sido coste-eficaces y han actuado como una herramienta de prevención en ciertos grupos de pacientes (*cure as prevention*)¹⁸¹⁻¹⁸⁴ su aplicación no es suficiente para desenmascarar todas las infecciones por VHC, ya que se estima que el 10,0-30,0% de los pacientes con infección crónica por VHC, carecen de algún tipo de factor de riesgo^{27,185}. En este sentido, se ha evaluado la realización de estudios basados en el cribado por rangos de edad, en las que la prevalencia de VHC es superior al resto de la población (*birth cohort testing*)^{183,186-188}. Así, en EEUU, la alta seroprevalencia de VHC en las personas nacidas entre 1945 y 1965 (*Baby Boomers*)¹⁸⁹ hizo que, en agosto de 2012, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) aprobasen la realización de un prueba de VHC, al menos una vez en la vida, en este grupo de personas, independientemente de la presencia de factores de riesgo¹⁹⁰. En el caso de España sin embargo, la PEAHC no recoge dentro de sus recomendaciones la realización de *birth cohort testing*, sino que tan solo recomienda el cribado de personas con algún factor de riesgo¹¹².

Además de los cribados basados en factores de riesgo y en *birth cohort testing*, se ha sugerido también la posibilidad de realizar programas de cribado universal. Actualmente, los estudios llevados a cabo en este contexto no han sido concluyentes, indicado que la realización de un cribado en población general puede ser o no coste-eficaz en función de las características de la misma o de la forma de evaluar dicho balance. Nuevos estudios que re-evalúen el coste-eficacia de un programa de cribado universal son requeridos para la implantación del mismo¹⁹¹⁻¹⁹⁴.

Igual de importante que la selección de la población diana y el tipo de cribado a implantar, es la prueba de cribado empleada. Esta prueba debe ser barata, fácil de usar y almacenar y estar diseñada para dar el resultado en un solo paso, evitándose el uso de pruebas en dos pasos, en los que una gran proporción de pacientes se pierden durante el proceso diagnóstico. Actualmente se dispone de varios tipos de pruebas de cribado con diferentes características: pruebas rápidas basadas en la detección de anticuerpos del VHC, *point-of-care tests (POCTs)* y pruebas en gota de sangre seca (*dried blood spot test, DBS*)¹⁹⁵. Las pruebas rápidas basadas en la detección de anticuerpos presentan la ventaja de un resultado rápido, pero requieren de un equipo

especial y un personal cualificado. Por su parte, las *POCTs*, desde su lanzamiento en 1990, se han presentado como una herramienta clave en los programas de cribado debido su rapidez, sensibilidad y especificidad y su facilidad de uso y transporte, así como la posibilidad de realizar la prueba en diferentes fluidos corporales (sangre, plasma, saliva)¹⁹⁶. Los *DBS*, consisten en la toma de una pequeña cantidad de sangre en un papel de filtro y su uso permite la detección simultánea del anticuerpo del VHC y de la carga viral. Sin embargo, el empleo de *DBS* requiere su envío a laboratorios especializados, con lo que el resultado de la prueba no es instantáneo y podría perderse así el seguimiento del paciente¹⁹⁷.

II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El lanzamiento de los antivirales de acción directa (AADs) ha marcado un hito en la historia de la infección por el Virus de la Hepatitis C (VHC), al permitir no solo alcanzar tasas de respuesta viral sostenida (RVS) superiores al 90% en la mayoría de los pacientes, sino también el hacer cada vez más plausible la posibilidad de erradicar la infección por VHC. No obstante, en este nuevo escenario terapéutico, continúa siendo necesaria la optimización tanto de los tratamientos como de su monitorización, así como la búsqueda de marcadores que permitan identificar poblaciones con mayor riesgo de progresión de la enfermedad. Además y, pese a disponerse de herramientas terapéuticas altamente eficaces, la erradicación de la infección por VHC requiere una mejora en su diagnóstico. En la actualidad se estima que un 80% de la infección por VHC a nivel global no ha sido diagnosticada. En este sentido, la implementación de estrategias de cribado activas y optimizadas teniendo en cuenta las características epidemiológicas de la infección en cada área geográfica, se presenta como una herramienta altamente necesaria para la erradicación de esta infección

En este contexto los objetivos de la presente tesis doctoral fueron:

- 1) Caracterizar y evaluar el impacto de los haplogrupos europeos de ADN mitocondrial (ADNmt) en la evolución clínica de la infección crónica por el VHC, en una cohorte de pacientes monoinfectados VHC y co-infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) en el área sanitaria de A Coruña.
- 2) Analizar y describir la dinámica viral del VHC en las primeras fases de las terapias basadas en AADs y evaluar su utilidad en la optimización de la duración y monitorización de las mismas, en una cohorte de pacientes con infección crónica por VHC y estadios de fibrosis hepática avanzada del área Sanitaria de A Coruña.
- 3) Desarrollar un programa de cribado activo del VHC en personas nacidas entre 1969-1969 con un estado serológico desconocido, en cuatro centros de atención primaria de la ciudad de A Coruña, con el fin de identificar posibles infecciones no diagnosticadas, así como estudiar la seroprevalencia de VHC en dicha población.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 1

1.- Diseño, ámbito de estudio

Se realizó un estudio retrospectivo, de corte transversal en pacientes con infección crónica por VHC, en seguimiento clínico del Servicio de Medicina Interna B de la *Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña (XXIAC)* y de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Servicio de Medicina Interna de la *Xerencia de Xestión Integrada de Ferrol (XXIF)*, ambos integrados dentro de la red del *Servizo Galego de Saúde (SERGAS)*.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación (CEI) de Galicia (código de registro 2014/568) y ha sido realizado de acuerdo con las normas de buena práctica clínica de la Declaración de Helsinki.

2.- Sujetos de estudio

Los sujetos seleccionados para este estudio fueron pacientes con serología positiva para VHC y carga viral VHC positiva (ARN-VHC+), mayores de 18 años y en seguimiento clínico en el XXIAC/XXIF. Asimismo, todos los pacientes incluidos en este trabajo, firmaron el consentimiento informado (**Anexo A**) para participar en la línea de investigación de enfermedades infecciosas, debidamente autorizada por el CEI de Galicia con código 2013/244 y registrada en la Sección de Colecciones del Registro Nacional de Biobancos con código C.0002530.

De cada uno de los pacientes de la investigación, con ayuda de un clínico especialista, se recogieron variables sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas (**Anexo B**) con las que se elaboró una base de datos. La evaluación de la dureza hepática se realizó mediante ET (*FibroScan*) y sus valores fueron recodificados a escala METAVIR (**Tabla IV**). Los datos obtenidos de cada paciente fueron codificados y se cumplió la garantía de la confidencialidad de la información según la ley orgánica de protección de datos de carácter personal 15/1999.

Tabla IV. Relación entre el grado de dureza hepática (kPa) y el grado de fibrosis según la escala METAVIR.

| Grado de fibrosis (Escala METAVIR) | Dureza hepática (<i>FibroScan</i> , kPa) |
|------------------------------------|---|
| F0-F1 | 2,5-7 |
| F2 | 7,1-9,3 |
| F3 | 9,4-12,5 |
| F4 | >12,5 |

kPa: kiloPascal

3.- Obtención y procesamiento de las muestras

Para determinar los haplogrupos mitocondriales fue necesario el aislamiento del ADNmt de cada uno de los pacientes a partir de células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs*), las cuales se aislaron a partir de una muestra de 8 mL de sangre periférica total almacenada en un tubo de anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA*).

Como método de aislamiento de *PBMCs*, se empleó una centrifugación en gradiente de densidad con *Ficoll*. El *Ficoll* permite separar los componentes de la sangre en función de su densidad (componentes de alta y baja densidad), debido a la migración diferencial de los mismos durante la centrifugación. Así, tras el proceso de centrifugado, se obtienen plaquetas y *PBMCs* en la parte superior de la capa de *Ficoll* (componentes de baja densidad) y glóbulos rojos y granulocitos en la parte inferior de la misma (componentes de alta densidad).

El protocolo empleado para el aislamiento de *PBMCs* comenzó añadiendo 6 mL de *Ficoll* (*Lymphocytes Isolation Solution; Rafer, España*), previamente atemperado a 20 °C, en un tubo de *Falcon* (*Corning Science, EEUU*), al que posteriormente se le añadieron 8 mL de sangre periférica total. El conjunto se centrifugó a temperatura ambiente, sin aceleración ni deceleración, durante 30 minutos a 2.000 r.p.m.

Tras la centrifugación, se formaron tres fases (una fase superior con plasma, plaquetas y *PBMCs*; una fase intermedia con *Ficoll* y una fase inferior con glóbulos rojos y granulocitos) y se procedió a la recogida de los *PBMCs* con ayuda de una pipeta *Pasteur*. Tras este aislamiento, se procedió a la purificación de éstos mediante sucesivos lavados con tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline, PBS; Sigma, EEUU*) y centrifugaciones cortas a bajas revoluciones (1.500 r.p.m. durante 5 minutos).

Con el fin de determinar la cantidad de *PBMCs* contenidos en cada muestra de sangre, se procedió a su recuento mediante una cámara de conteo desechable (*Chamber slides; Celeromics Technologies, España*) y su visualización en microscopio de campo claro. Todas las muestras se tiñeron con *Certistain Cresyl Violete (acetate) for Microscopy* (*Merck-Millipore, Alemania*). Esta tinción, debido a su composición, facilita la detección de los *PBMCs* y elimina los posibles glóbulos rojos que pueda contener la muestra y que alteran el cómputo global de células detectadas. Así, el cristal violeta presente en la tinción, tiñe los núcleos de las células de un color morado intenso, mientras que el acético glacial produce un choque osmótico que rompe las

membranas de los glóbulos rojos. Una vez estimado el número de *PBMCs*, se procedió al cálculo del volumen de muestra necesario para obtener una concentración final de 12 millones de células. Las muestras se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 3 minutos, eliminando el sobrenadante y almacenando tan solo el *pellet* seco de células.

Las alícuotas de *PBMCs* obtenidas tras el procedimiento descrito fueron almacenadas a -80 °C en el Biobanco de A Coruña de la XXIIAC, dentro de la colección del Servicio de Medicina Interna B de la XXIIAC dentro de la colección de Enfermedades Infecciosas mencionada con anterioridad.

4.- Extracción del ADN mitocondrial

La extracción de ADNmt a partir de los *PBMCs* aislados se realizó por medio del *kit QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Alemania). El principio de extracción de este *kit* se basa en la unión específica del ADN a una membrana de sílica gel inmovilizada en una columna, mientras el resto de los contaminantes (cationes divalentes y proteínas) pasan a través de la misma tras dos pasos sucesivos de lavado con tampones. Finalmente, el ADN purificado se separa y se eluye de la membrana tras un tercer lavado con un tampón de elución.

Tras la resuspensión de los *pellets* celulares de *PBMCs* en 200 µL de *PBS*, la extracción subsecuente se automatizó empleando el *QIAcube* (Qiagen, Alemania) programado para un volumen final de elución en 100 µL de *buffer* AE (Tris-Cl 10 mM; EDTA 0,5mM; pH 9,0). La automatización del proceso permitió una extracción más eficiente del ADNmt y una mayor reproducibilidad de los resultados.

Una vez extraído el ADN, se comprobó la concentración y pureza del mismo en las diferentes muestras. Para ello, se empleó el espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Fischer Scientific, EEUU) y el *software* asociado del fabricante, midiendo las absorbancias (Abs) a 280 nm, 260 nm y 230 nm para valorar: (i) la concentración de ADN (Abs 260), (ii) la contaminación con proteínas (Abs 260/280) y (iii) la contaminación con sales y/o alcoholes (Abs 260/230).

Las alícuotas de ADN obtenidas y cuantificadas tras el procedimiento descrito fueron almacenadas a -80 °C en el Biobanco de A Coruña de la XXIIAC, dentro de la colección de muestras de la línea de investigación en enfermedades infecciosas citada anteriormente.

5.- Determinación del haplogrupo de ADN mitocondrial

La determinación del haplogrupo de ADNmt se basa en el análisis simultáneo y combinado de la secuencia de varios *SNPs* localizados en posiciones concretas del genoma mitocondrial. La determinación de estos *SNPs* y, por tanto, del haplogrupo mitocondrial, puede ser realizada por diversas técnicas entre las que destacan *PCR-RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR*) o análisis de los fragmentos de restricción resultantes tras el uso de una combinación de enzimas de restricción¹⁵³; el análisis de las cuvas de fusión con sondas de hibridación alelo específicas¹⁹⁸ o por el ensayo de Extensión de Base Simple (*Single Base Extension, SBE*)¹⁹⁹.

En el presente trabajo, la obtención de los seis haplogrupos mitocondriales europeos más comunes (H, V, K, U, T y J); del *clúster* de haplogrupos *Others*, que engloba tres haplogrupos mitocondriales europeos minoritarios (I, W, X) y del haplogrupo minoritario SHV, se realizó por medio de la técnica *SBE*, en base a la evaluación de la secuencia de seis *SNPs*. El ensayo *SBE* (denominado *multiplex SBE* cuando se analizan de forma simultánea varios *SNPs*) es utilizado como metodología de rutina para la obtención del haplogrupo mitocondrial por el grupo de Genómica del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)¹⁹⁹. Asimismo, el uso de *SBE* ha sido empleado por otros autores²⁰⁰⁻²⁰².

La técnica de *multiplex SBE* permite la determinación de las secuencias, de forma simultánea, de un conjunto de *SNPs* por medio del uso de cebadores específicos (sin marcar) adyacentes al *SNP* a determinar (su extremo 3' es inmediatamente contiguo a la base que se desea interrogar) en una *PCR* en la que se emplean sólo didesoxinucleótidos trifosfato terminadores (*ddNTPs*) marcados con un fluorocromo diferente. Durante la *PCR*, cada uno de los cebadores diseñados (uno para cada *SNP*) hibridará de forma específica con la secuencia de ADNmt molde que contiene el *SNP* a analizar, exactamente en una base inmediatamente anterior a la posición del polimorfismo. Debido a que la *PCR* se realiza sólo empleando *ddNTPs* marcados, cuando la base complementaria al *SNP* objeto de estudio es incorporada por la ADN polimerasa, la fase de elongación se detiene, dando lugar a fragmentos marcados en una única base. Posteriormente, los fragmentos obtenidos son analizados por medio de un secuenciador, de forma que la longitud de los fragmentos nos indicará la posición polimórfica y la fluorescencia emitida por el *ddNTP* marcado nos permitirá identificar la secuencia del *SNP* (**Figura 7**). De este modo, se obtiene un perfil único de electroferograma para cada uno de los 8 haplogrupos a analizar (**Figura 8**).

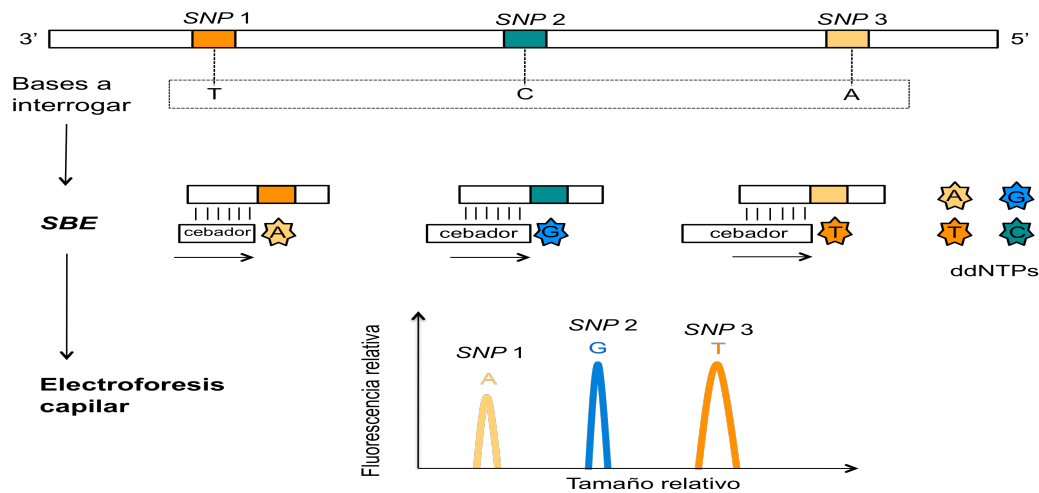


Figura 7. Esquema explicativo del principio de la técnica de Extensión de base simple (*Single Base Extension*, SBE). En el esquema, se pretende determinar el conjunto de tres SNPs (SNPs 1,2,3). Para ello, se realiza la técnica de SBE, mediante el empleo de tres cebadores de tamaño diferente para cada uno de los SNPs y la utilización de ddNTPs marcados con un fluoróforo diferente. Tras la PCR en la que tiene lugar el SBE, se realiza una electroforesis capilar en un secuenciador, en el que la longitud de los fragmentos (tamaño relativo) nos indicará la posición polimórfica a analizar y la fluorescencia emitida por el ddNTP marcado (fluorescencia relativa) nos permitirá identificar la secuencia del SNP. A: adenina; C: citosina; ddNTPs: didesoxinucleótidos trifosfato terminadores; G: guanina; SBE: *Single Base Extension*; SNP: *Single Nucleotide Polimorphism*; T: timina.

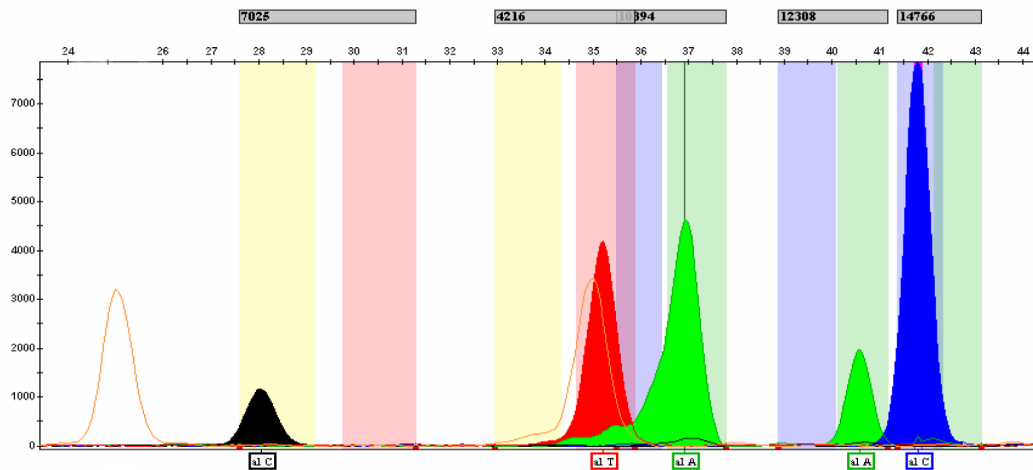


Figura 8. Electroferograma obtenido del software de análisis de secuencias *GeneMapper v3.5* (*Applied Biosystems*, EEUU) en el que se representa el perfil de picos característico del haplogrupo mitocondrial H. El primer pico de la izquierda corresponde con el tamaño estándar de 25 pares de bases (pb). El eje Y representa la intensidad de la señal (unidades de fluorescencia relativas) y el eje x el tamaño (pb).

5.1.- Amplificación de los *SNPs* de ADNmt (*multiplex PCR*)

Previamente a la realización de la técnica *multiplex SBE*, fueron requeridas una serie de etapas intermedias. La primera de ellas fue una *PCR* múltiple (*multiplex PCR*), que permitió la amplificación de los fragmentos de ADNmt que contenían cada uno de los *SNP* informativos necesarios para la caracterización de los haplogrupos mitocondriales en una única reacción.

La selección de los seis sitios polimórficos analizados en el presente estudio (7025, 14766, 10394, 4577, 12308 y 4216) para la determinación del haplogrupo mitocondrial (**Tabla V**) se realizó de acuerdo a estudios anteriores^{153,203}. Los cebadores empleados para la amplificación de cada uno de los *SNPs* a analizar se recogen en la **Tabla VI**.

Tabla V. Posiciones polimórficas del ADNmt analizados para la determinación de los seis haplogrupos mitocondriales europeos más comunes (H,V,K,U,T,J), del *cluster Others* (I, W, X) y del haplogrupo minoritario SHV.

| Haplogrupo | Posiciones polimórficas evaluadas | | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-------|-------|------|-------|------|
| | 7025 | 14766 | 10394 | 4577 | 12308 | 4216 |
| H | C | C | A | G | A | T |
| V | T | C | A | A | A | T |
| SHV | T | C | A | G | A | T |
| K | T | T | G | G | G | T |
| U | T | T | A | G | G | T |
| T | T | T | A | G | A | C |
| J | T | T | G | G | A | C |
| Others (I, W,X) | T | T | A/G | G | A | T |

La *multiplex PCR* se generó a un volumen final de 14 µL para cada una de las muestras, tras añadir 1 µL de 1X *Reaction Buffer* (*Bioline*, Reino Unido), 0,4 µL de cloruro de magnesio (MgCl₂) (*Bioline*, Reino Unido), 0,08 µL de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (*dNTPs*) (*Bioline*, Reino Unido), 0,06 µL de *BioTaq ADN polimerasa* (*Bioline*, Reino Unido), 0,248 µL de cebador 12106, 0,36 µL de cebador 4185, 0,16 µL de cebador 6960, 0,16 µL de cebador 14601, 0,16 µL de cebador 10364, 0,248 µL de cebador 12413, 0,18 µL de cebador 4542, 0,18 µL de cebador 5120, 0,16 µL de cebador 7433, 0,16 µL de cebador 14950, 0,16 µL de cebador de 10526, 6,284 µL de agua ultrapura para biología molecular (*Ultrapure Water tested for Molecular Biology applications*; *Merck-Millipore*, Alemania) y 4 µL de ADN (80 ng).

El programa empleado para la amplificación fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos; 45 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94°C durante 60 segundos, una hibridación a 55°C durante 60 segundos y una elongación a 72°C durante 60 segundos y, un ciclo final de extensión a 70°C durante 10 minutos.

Durante todo el proceso de amplificación, se utilizaron controles negativos, sin ADN con el fin de comprobar las posibles contaminaciones externas.

Tabla VI. Secuencias de los cebadores empleados en la *multiplex PCR* para la amplificación de las seis posiciones polimórficas del ADNmt analizadas.

| Posición polimórfica | Cebador <i>multiplex PCR</i> | Posición |
|----------------------|--------------------------------|----------|
| 7025 | 5'-CTGACTGGCATTGTATTAGCA-3' | 6960F |
| | 5'-GTATACGGGTTCTTCGAATG-3' | 7433R |
| 14766 | 5'-GAGAAGGCTTAGAAGAAAACCCAC-3' | 14601F |
| | 5'-GTGGGCGATTGATGAAAAGGC-3' | 14950R |
| 10394 | 5'-GGCCTATGAGTGACTACAAAA-3' | 10364F |
| | 5'-TATTCCTAGAAGTGAGATGGT-3' | 10526R |
| 4577 | 5'-CCTACCACTCACCCTAGCATTAC-3' | 4185F |
| | 5'-TAGGAATGCGGTAGTAGTTAG-3' | 5120R |
| 12308 | 5'-CAACCCCGACATCATTACCGGGT-3' | 12106F |
| | 5'-GGGTTAACGAGGGTGGTAAGG-3' | 12413R |
| 4216 | 5'-CCTACCACTCACCCTAGCATTAC-3' | 4185F |
| | 5'-GCGAGCTTAGCGCTGTGATGAG-3' | 4542F |

F: cebador sentido (*forward*); R: cebador antisentido (*reverse*).

Tras la *multiplex PCR*, se comprobó la correcta amplificación de las seis posiciones polimórficas objeto de estudio por medio de una electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos. La técnica de electroforesis permite verificar que el ADN resultante de la amplificación se corresponde con el tamaño de amplicón esperado.

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1,5% tenido con 3 µL de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Life Technologies, EEUU). Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga (azul de xianol, azul de bromofenol y glicerol en relación 1:10) y se dejaron correr a 80 mV. Como marcador de peso molecular, se empleó el *DNA*

Molecular Weight Marker XIV (Roche Applied Science, Alemania), el cual permite distinguir bandas de un tamaño entre 100-1.500 pb, con un intervalo de 100 pb entre cada una de las bandas.

Para la visualización del gel se empleó el equipo *Fujifilm Luminescent Image Analyzer LAS 3000* (Fujifilm, Japón), un transiluminador conectado a una cámara y el programa informático asociado *LAS3000 Image Reader* (Fujifilm, Japón).

5.2.- Purificación de los productos de PCR (*ExoSAP-IT*)

Tras la realización de la *multiplex PCR* y la comprobación de la correcta amplificación de la misma por medio de una electroforesis en gel de agarosa, se realizó una purificación de los productos de *PCR* obtenidos con el fin de eliminar posibles contaminantes (cebadores y *dNTPs* no incorporados durante la *multiplex PCR*), que podrían interferir en la técnica de *multiplex SBE*.

Como método de purificación se empleó el *ExoSAP-IT* (Thermo Fischer Scientific, EEUU). Este método se basa en el uso simultáneo de dos enzimas hidrolíticas: una exonucleasa I (*Exo-I*) y una fosfatasa alcalina de camarón (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, *SAP*) que eliminan residuos de ADN monocatenarios (restos de cebadores) y *dNTPs* no incorporados respectivamente.

El método *ExoSAP-IT* se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Así, se añadieron 0,6 µL de mezcla de enzimas por cada 1,5 µL de producto de *PCR* y posteriormente se realizó un ciclo de activación de las enzimas a 37°C durante 15 minutos, seguido de un ciclo de inactivación a 80°C durante 15 minutos.

5.3.- Extensión de Base Simple (*Single Base Extension*) y purificación de los productos de PCR

Una vez purificados los productos obtenidos de la *multiplex PCR* se procedió a la determinación de la secuencia de cada uno de los *SNPs* objeto de estudio por medio de la técnica *multiplex SBE*, siguiendo las recomendaciones del *kit* comercial *SNaPshot Multiplex Kit* (Applied Biosystems, EEUU) con ciertas modificaciones puestas a punto por el grupo de Genómica del INIBIC.

Los seis cebadores utilizados para llevar a cabo esta reacción (**Tabla VII**), fueron diseñados de acuerdo a las siguientes características: (i) ser contiguos, en sus

extremo 3' a la base que se quiere interrogar; (ii) tener un tamaño mínimo de 20 nt y (iii) diferir entre ellos en, al menos, 6 nt. La diferencia de longitud de los cebadores es utilizada para evitar que éstos se solapen durante la carrera en el secuenciador y permitir así conocer la posición polimórfica que se está evaluando. En el caso de que no sea posible diseñar cebadores con estas características se pueden añadir nts no específicos al extremo 5' de los mismos, con el fin de incrementar su longitud.

Tabla VII. Secuencias de los cebadores empleados en la *multiplex SBE* para la determinación de la secuencia de los seis polimorfismos de un solo nucleótido (*SNPs*) del ADNmt analizados.

| Posición polimórfica | Cebador <i>multiplex SBE</i> | SNP | Posición |
|----------------------|--|---------|----------|
| 7025 | 5'-ACACGACACGTACTACGTTGTAGC-3' | C7028T | 7004F |
| 14766 | 5'-cgatcATGAGTGGTTAATTAATTTTATTAGGGGGTTA-3' | T14766C | 14798R |
| 10394 | 5'-ataTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGA-3' | A10398G | 10368F |
| 4577 | 5'-(at) ₇ TTTTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACAT-3' | G4580A | 4548F |
| 12308 | 5'-(tacg)5aCCATTGGTCTTAGGCCCCAA-3' | A12308G | 12288F |
| 4216 | 5'-cgCCACTCACCTAGCATTACTTATATGA-3' | T4216C | 4189F |

En letra minúscula, se recogen los nucleótidos no específicos. F: hebra sentido (*forward*); R: hebra antisentido (*reverse*); *SBE*: *Single Base Extensión*; *SNP*: *Single Nucleotide Polimorphism*.

La reacción de *multiplex SBE* se realizó a un volumen final de 10 µL. Para ello, se añadió 1 µL de *SNaPshot Multiplex Kit*, 2,1 µL de producto de *PCR* purificado, 0,1 µL de cebador T4216C, 0,1 µL de cebador C7028T, 0,16 µL de cebador T14766C, 0,16 µL de cebador A10398G, 0,16 µL de cebador G4580A y 0,16 µL de cebador A12308G. El volumen final de 10 µL de reacción se completó añadiendo 6,76 µL de agua ultrapura para biología molecular (*Ultrapure Water tested for Molecular Biology*).

Las condiciones empleadas para llevar a cabo la técnica de *multiplex SBE* fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 96°C durante 1 minuto y 25 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, una hibridación a 60°C durante 5 segundos y una elongación a 60°C durante 30 segundos.

Los productos de la *multiplex SBE* fueron purificados. La técnica de purificación empleada consistió en el uso de *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (*Life Technologies*, EEUU), una fosfatasa alcalina que permite la eliminación de aquellos

ddNTPs que no han sido incorporados en la reacción de *multiplex SBE*. La reacción se realizó a un volumen final de 20 μL . Para ello se añadieron 2 μL de *FastAP buffer*, 1,2 μL de enzima, 6,8 μL μL agua ultrapura para biología molecular (*Ultrapure Water tested for Molecular Biology applications*) y 10 μL del producto de reacción obtenido de la *multiplex SBE*. El programa empleado para llevar a cabo la reacción fue el siguiente: un ciclo de activación de la enzima a 37°C durante 10 minutos y un ciclo de inactivación de la enzima a 75°C durante cinco minutos.

5.4.- Secuenciación de los productos de *multiplex SBE*

Previamente al análisis de los productos de *multiplex SBE* en el secuenciador automático de ADN de tecnología capilar *ABI 3130 XL* (*Applied Biosystems*, EEUU), se procedió a la preparación de la muestra. Para ello, se añadieron 9,35 μL de *Hi-Di Formamide* (*Applied Biosystems*, EEUU) y 0,45 μL de marcador de peso molecular (*120 Liz Size Standard*, *Applied Biosystems*, EEUU) por cada 0,5 μL de producto de *multiplex SBE* purificado. El conjunto se sometió a un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos.

Tras este paso de preparación, las muestras fueron introducidas en el secuenciador. El sistema de configuración se basa en un capilar de 36 centímetros de longitud, que contenía un polímero con urea que permite la migración de los productos [*Performance Optimized Polymer 4 (POP4)*; *Applied Biosystems*, EEUU]. El módulo de ejecución de la carrera en el secuenciador consistió en 22 segundos de inyección y 16 minutos de carrera, con una tensión de funcionamiento de 15 Kvolt.

Una vez finalizada cada una de las carreras del secuenciador, se analizó el conjunto de los datos por medio del programa informático *GeneMapper v3.5* (*Applied Biosystems*, EEUU) que permitió la asignación de los diferentes alelos (*SNPs*), empleando una secuencia referencia que abarca todas las variantes estudiadas.

6.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando las variables sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas previamente recogidas y el haplogrupo de ADNmt, de cada uno de los pacientes participantes en este estudio.

Las características basales de la población se expresaron como medias (\pm desviación estándar) o medianas [rango intercuartil] en el caso de las variables cuantitativas; y

como porcentaje (valor absoluto) en el caso de las variables cualitativas. En todos los estudios se comprobó la normalidad en la distribución de las diferentes variables cuantitativas mediante el *test* de *Kolmogorov-Smirnov*. Para la comparación de variables se utilizó el *test Chi cuadrado* (χ^2) o el *test* exacto de *Fisher* para variables cualitativas y el *test T de Student* o el *test U de Mann-Whitney* para variables cuantitativas, en función de si se trataba de una variable con distribución normal o no, respectivamente.

Para determinar el grado de asociación de las variables objeto de estudio con los haplogrupos de ADNmt se empleó el *test* χ^2 o el *test* exacto de *Fisher*, en el caso de las variables cualitativas y los *test* de correlación de *Pearson* o *Spearman* cuando las variables eran cuantitativas. Para evitar el posible efecto confusor de ciertas variables, el análisis estadístico se completó por medio de un análisis multivariante de regresión logística binario.

En todos los casos, los *test* se consideraron como estadísticamente significativos cuando los *p-valores* obtenidos fueron inferiores a 0,05.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el paquete estadístico *SPSS v19.0* (*SPSS Inc*, EEUU) y bajo el asesoramiento de la Unidad de Epidemiología del INIBIC.

IV.- MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 2

1.- Diseño y ámbito de estudio

Se realizó un estudio longitudinal prospectivo en pacientes con infección crónica por VHC, en seguimiento clínico en el Servicio de Medicina Interna B de la XXIAC y que iniciaron tratamiento frente al VHC en el periodo marzo de 2014-junio de 2015.

De cada uno de los pacientes se evaluó la dinámica de la carga viral del VHC previa al inicio del tratamiento (determinación basal ó D_0), a los días 3,5,7,10,12 y 14 y a semana 4,8,12,15,20,24 y 36 tras el inicio del tratamiento. Además se evaluó la carga viral al finalizar el tratamiento (*end of treatment*, EOT) y la RVS_{12} . La **Figura 9** recoge el cronograma llevado a cabo para la determinación de la carga viral del VHC en función de la duración del tratamiento.

Este estudio ha sido aprobado por el CEI de Galicia (código de registro 2013/426) y ha sido realizado de acuerdo con las normas de buena práctica clínica de la Declaración de Helsinki.

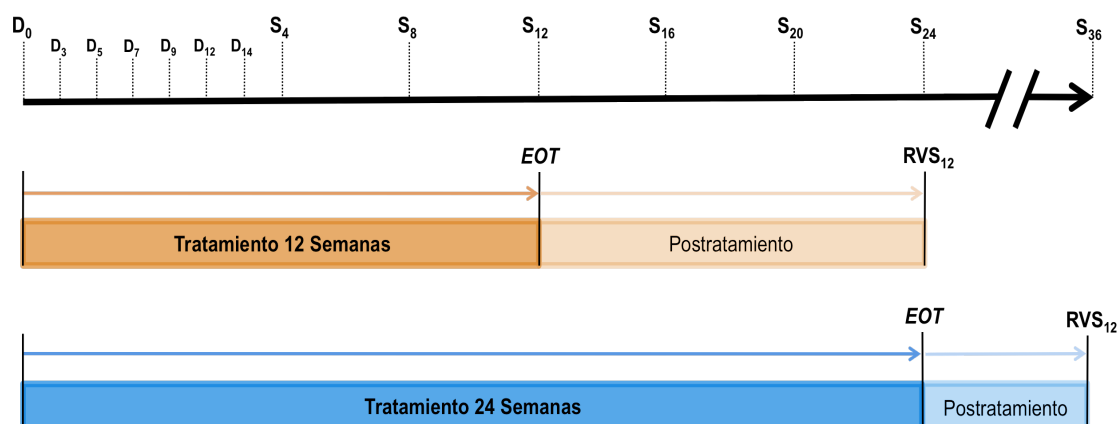


Figura 9. Cronograma seguido para la determinación de la carga viral del VHC en función de la duración del tratamiento (12 ó 24 semanas). En la parte superior de la figura se reflejan los días y semanas en los que la carga viral fue analizada. Además, se incluyen los puntos EOT y RVS_{12} . El cronograma no está a escala. D: día; EOT : *end of treatment*; RVS_{12} : respuesta viral sostenida tras 12 semanas desde el fin del tratamiento; S: semana.

2.- Sujetos de estudio

Los sujetos seleccionados para este estudio fueron pacientes en seguimiento clínico en el XXIAC, mayores de 18 años, con serología positiva para VHC e infección activa, que iniciaron tratamiento frente al VHC basado en el uso de AADs. Todos los pacientes que participaron en el estudio recibieron terapias libres de IFN.

Todos los pacientes incluidos en este trabajo firmaron el consentimiento informado (**Anexo A**) para participar en la línea de investigación de enfermedades infecciosas debidamente autorizada por el CEI de Galicia con código 2013/244 y registrada en la Sección de Colecciones del Registro Nacional de Biobancos con código C.0002530.

De cada uno de los pacientes de la investigación, con ayuda de un clínico especialista, se recogieron, a D_0 , variables sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas (**Anexo C**) con las que se elaboró una base de datos. La fibrosis hepática fue evaluada mediante ET (*FibroScan*) y expresada en kPa. La presencia de cirrosis, fue definida como valores de *FibroScan* superiores a 12,5 kPa.

Los datos obtenidos de cada paciente fueron codificados y en todo momento se cumplió la garantía de la confidencialidad de la información según la ley orgánica de protección de datos de carácter personal 15/1999.

3.- Obtención y procesado de las muestras

En primer lugar, para determinar la dinámica de la carga viral del VHC, fue necesario el aislamiento del ARN viral de cada uno de los pacientes. La fuente seleccionada para el aislamiento de dicho material genético fue el plasma obtenido a partir de una muestra de 8 mL de sangre periférica total almacenada en un tubo de anticoagulante *EDTA*.

Como método de aislamiento del plasma, se empleó una centrifugación en gradiente de densidad con *Ficoll*, descrito previamente en el apartado 3 del Material y Métodos del Objetivo 1. No obstante, en esta ocasión se tomó, tras la centrifugación, la fase superior correspondiente al plasma.

Las alícuotas de plasma obtenidas tras el procedimiento descrito fueron almacenadas a -80°C en el Biobanco de A Coruña de la *XXIAC*, dentro de la colección del Servicio de Medicina Interna de la *XXIAC*, debidamente autorizada por el CEI de Galicia con código 2013/244 y registrada en la Sección de Colecciones del Registro Nacional de Biobancos con código C.0002530.

4.- Cuantificación de la carga viral del VHC

Para llevar a cabo la cuantificación de la carga viral del VHC se empleó el *kit* comercial *Abbott RealTime HCV* (*Abbott Molecular*, EEUU) y el sistema *m2000 RealTime* (*Abbott Molecular*, EEUU). El uso combinado de ambos permite la cuantificación absoluta de los niveles de carga viral presentes en una muestra de plasma, con un rango lineal de

100.000.000-12 UI/mL y un límite inferior de detección (*Lower Limit of Detection*, *LLOD*) de 12 UI/mL.

Este sistema se basa en el uso simultáneo de la tecnología de *PCR* de transcripción reversa (*RT-PCR*) y la detección, a tiempo real, de la fluorescencia emitida en dicha reacción (*Real time PCR*) durante una fase de hibridación a bajas temperaturas. La cuantificación de la fluorescencia emitida permite la determinación de la carga viral al ser proporcional al logaritmo (log) de la concentración del ARN del VHC presente en la muestra de plasma original.

La emisión de fluorescencia es producida por el uso de cebadores específicos doblemente marcados (*single stranded linear probes*), un sistema que garantiza la emisión de fluorescencia sólo cuando éstas hibridan con la secuencia diana. La secuencia diana de este ensayo se localiza en la región *5'-UTR* del genoma viral, una región específica del VHC y altamente conservada, que garantiza la correcta cuantificación de la carga viral con independencia del genotipo del VHC analizado.

Además de lo indicado anteriormente, el sistema *Abbott RealTime HCV* garantiza una correcta cuantificación de la carga viral al emplear: (i) un sistema de control interno en cada una de las muestras analizadas (*Abbott RealTime HCV Internal Control*; *Abbott Molecular*, EEUU) y (ii) tres muestras control con cargas virales conocidas (*Control -*, *Control L* y *Control H*; *Abbott RealTime HCV Control Kit*) en cada uno de los ensayos. El control interno consiste en una secuencia de ARN no relacionada con el VHC (gen de la hidroxipiruvato reductasa de *Cucubita pepo*) encapsulada y diluida en plasma humano libre de VHC, que se extrae, amplifica y cuantifica dentro de cada una de las muestras y de forma paralela a la determinación de la carga viral del VHC. De este modo, el ciclo umbral (*cycle threshold* o C_T) del control interno deberá mantenerse constante durante todas las reacciones, con el fin de garantizar que la extracción, procesado y posterior análisis ha sido realizado de forma correcta.

Por otro lado, las muestras control consisten en plasma humano testado frente a anticuerpos VHC que contienen secuencias de ARN viral no infectivas, encapsuladas y con concentraciones conocidas. Estas muestras control son extraídas y cuantificadas como una muestra más durante todo el proceso, actuando como un segundo sistema de control de calidad de la técnica.

4.1.- Extracción del ARN viral

Debido al doble sistema de control del *Abbott RealTime HCV*, todas las muestras del estudio, así como las muestras control se mezclaron, previamente al proceso de extracción, con 19,4 μ L de control interno (*Abbott RealTime HCV Internal Control*) y 5,6 μ L de *Carrier RNA* (*Qiagen*, Alemania) por cada muestra procesada. Cada vial de *Abbott RealTime HCV Internal Control* fue utilizado una única vez.

La extracción del ARN viral a partir del plasma aislado se realizó por medio del *kit QIAamp Viral RNA Mini Kit* (*Qiagen*, Alemania). El principio de extracción de este *kit* es similar al previamente descrito en la extracción del ADNmt. El proceso de extracción se inicia con la lisis, en condiciones altamente desnaturalizantes, de las partículas virales presentes en el plasma y la liberación de las moléculas de ARN viral contenidas en las mismas. El ARN viral, se une entonces de forma específica a una membrana de sílica gel inmovilizada en una columna, mientras el resto de los contaminantes (cationes divalentes y proteínas) pasan a través de la misma tras dos pasos sucesivos de lavado con tampones. Finalmente, el ARN viral purificado se separa y se eluye de la membrana tras un tercer lavado con un tampón de elución.

La extracción del ARN viral se realizó a partir de 140 μ L de plasma en un sistema automatizado *QIAcube* y utilizando el *kit* indicado previamente. Todas las extracciones fueron programadas para un volumen final de elución del ARN de 60 μ L en *buffer AVE*, compuesto por agua libre de ribonucleasas (*RNasas*) y NaN_3 al 0,04%. La automatización del proceso permitió una extracción más eficiente del ARN viral y una mayor reproducibilidad de los resultados. Tal y como se mencionó anteriormente, en cada una de las rondas de extracción, se extrajo también el ARN presente en las tres muestras control (*Control -*, *Control L* y *Control H*) del *Abbott RealTime HCV Control Kit*.

Una vez obtenido el ARN viral, éste fue inmediatamente procesado para su cuantificación.

4.2.- Generación de la recta de calibrado y cuantificación del ARN viral

Previamente a la cuantificación de las muestras y controles, se requirió de la generación de una recta de calibrado, a partir de la cual se calcularon las cargas virales presentes en las muestras. Una recta de calibrado permite relacionar los valores de C_T obtenidos en la *Real Time PCR*, con los niveles de carga viral presentes

en una muestra. En este caso, la recta se generó a partir del análisis, por triplicado, de los calibradores A y B del *kit Abbott RealTime HCV Calibrator Kit* (Abbott Molecular, EEUU), dos muestras con niveles conocidos de ARN viral en los extremos del rango lineal de la técnica. La recta de calibrado fue recalculada cuando se produjeron cambios en el número de lote del *kit Abbott RealTime HCV Amplification Reagent Pack* o del *kit Abbott RealTime HCV Control Kit*.

Una vez elaborada la recta de calibrado, se procedió a la cuantificación del ARN viral por medio del *kit Abbott RealTime HCV Amplification Reagent Pack* (Abbott Molecular, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Así, se procedió a la mezcla y posterior dispensación de los componentes de la reacción (*Thermostable rTth Polymerase Enzyme*, *HCV Oligonucleotide Reagent* y *Activation Reagent*) en una placa de *PCR Abbott 96-Well Optical Reaction Plate* (Abbott Molecular, EEUU) junto con el ARN previamente aislado. Las placas fueron cubiertas con el sellador *Abbott Optical Adhesive Cover* (Abbott Molecular, EEUU) e introducidas en un termociclador *m2000 RealTime* (Abbott Molecular, EEUU).

Todas las placas de *PCR* realizadas, además de las muestras de los pacientes, fueron acompañadas de las tres muestras control (*Control -*, *Control L* y *Control H*) aportadas por el fabricante.

4.3.- Interpretación de los resultados

Los niveles de carga viral de VHC presentes en las muestras del estudio y en las tres muestras control fueron calculados de forma automática mediante el *software* del *m2000 RealTime* a partir de la recta de calibrado previamente diseñada. La carga viral se expresó como UI/mL o logUI/mL.

Cuando los valores de la carga viral analizada se encontraban dentro del rango dinámico de la técnica (1,08-8,00 logUI/mL), se obtuvieron valores discretos de la misma. En caso de que el valor arrojado por el *software* fuese de <12 UI/mL las cargas virales se consideraron, en este estudio, como cargas virales detectables no cuantificables. Por su parte, el valor definido por el *software* como “*target not detected*” (*TND*) fue interpretado como carga viral no detectable (ND).

5.- Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo teniendo en cuenta las variables sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas, así como los valores de la carga viral del VHC en los diferentes tiempos de estudio.

El estudio de la dinámica de la carga viral del VHC durante el tratamiento fue evaluado tomando como referencia la carga a D_0 de cada paciente. De este modo, se analizaron los descensos de la misma a día 3 (D_3), a semanas 4, 8 y a *EOT*. La presencia de RVS_{12} fue definida como valores de carga viral ND tras doce semanas desde el fin del tratamiento.

Las características basales de la población de estudio se expresaron como medias (\pm desviación estándar) o medianas [rango intercuartil] en el caso de las variables cuantitativas; y como porcentaje (valor absoluto) en el caso de las variables cualitativas.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el paquete estadístico *SPSS v19.0*.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 3

1.- Diseño y ámbito de estudio

Se realizó un cribado poblacional, simple, multifásico, selectivo y ocasional en cuatro centros de atención primaria de la ciudad de A Coruña, empleando como prueba de cribado el *test* rápido para la detección de anticuerpos del VHC en saliva *OraQuick HCV Rapid Antibody Test* (*OraSure Technologies Inc.*, EEUU). El estudio fue llevado a cabo en el periodo junio de 2015-febrero de 2016.

La ciudad de A Coruña tiene una población, en el año 2015, de 243.870 habitantes²⁰⁴ y su área sanitaria (XXIAC) posee una población referencia de 550.797 habitantes. La atención primaria de la ciudad de A Coruña está configurada en 14 centros de salud (CS) o de atención primaria. Para la realización de este estudio, se seleccionaron de forma aleatoria cuatro de éstos centros: CS San José, CS Federico Tapia, CS Abente y Lago y CS O Castrillón. Estos cuatro CS tienen asignados una población referencia, entre 15 y 65 años, de 35.629 personas (12.294, 7.513, 7.265 y 11.176 respectivamente) lo que representa el 21,9% de la población de ese rango de edad de la ciudad de A Coruña²⁰⁵.

El programa de cribado fue implementado en los CS indicados en colaboración con el Departamento de Salud Pública de Galicia y la XXIAC. Por su parte, el protocolo de investigación fue aprobado por el CEI de Galicia (código de registro 2013/101) y fue realizado de acuerdo con las normas de buena práctica clínica de la Declaración de Helsinki.

2.- Sujetos de estudio y cálculo del tamaño muestral

Los sujetos seleccionados para este estudio de cribado poblacional selectivo, fueron todas aquellas personas nacidas entre 1960 y 1969, pertenecientes a los cuatro CS anteriormente indicados. De esta población se recogieron, con ayuda de clínicos especialistas, datos epidemiológicos (año de nacimiento y sexo), así como la existencia de pruebas serológicas frente al VHC en su historial clínico. Sólo fueron candidatos a realizar la prueba de cribado aquellos sujetos carentes de una serología previa frente al VHC. La selección de los sujetos que cumplían este criterio de inclusión, fue realizada por medio de una selección aleatoria simple 1:1 (hombre:mujer), empleando el programa epidemiológico *Epidat 4.1* (*Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España*).

Los datos obtenidos de todos los sujetos del estudio fueron codificados y en todo momento se cumplió la garantía de la confidencialidad de la información según la ley orgánica de protección de datos de carácter personal 15/1999.

El criterio de selección de esta población diana se basó en los resultados de Mena y colaboradores²⁰⁶ quienes, tras analizar en el área sanitaria de A Coruña la prevalencia de anticuerpos positivos frente al VHC (acVHC+) en el periodo 2010-2014, identificaron el pico de prevalencia de acVHC+ en aquellas personas nacidas en la década de 1960.

La prevalencia estimada de acVHC+ en España es altamente variable en función del estudio evaluado, la población seleccionada para el mismo y la región geográfica estudiada. De este modo, se estima que la prevalencia puede ir desde el 0,6% hasta cifras cercanas al 2,6%³⁵⁻⁴¹. El PEAHC cifra la prevalencia de acVHC+ en un 1,7%⁴². Los estudios más recientes de cribado y estimación matemática han sugerido una prevalencia inferior, con tasas cercanas al 1,0% (1,2-0,4%)^{43,44}.

En el caso de Galicia, el número de estudios es escaso y sus resultados, debido a la población seleccionada en los mismos, sobreestiman dichas tasas. Así, el estudio de Mena y colaboradores estima que la prevalencia de acVHC+, en personas nacidas en la década de 1960, es del 7,0-8,0%²⁰⁶.

Teniendo en cuenta las prevalencias anteriormente descritas, en la **Tabla VIII** se recoge el tamaño muestral (número de pruebas de cribado necesarias) para detectar, con un nivel de confianza del 95% y una precisión de $\pm 0,5\%$, prevalencias de acVHC+ del 0,5 al 3,0%. El tamaño muestral fue calculado con el programa epidemiológico *Epidat 4.2*. Finalmente, se determinó la necesidad de realizar 764 pruebas de cribado, para estudiar una prevalencia esperada de acVHC+ oculta del 0,5%.

Tabla VIII. Cálculo del número de pruebas de cribado necesarias para detectar, con un nivel de confianza del 95% y una precisión del 0,5%, prevalencias de acVHC+ del 0,5-3,0%. La tabla recoge también, para cada prevalencia, el número de caso de acVHC+ esperados.

| Prevalencia acVHC+ (%) | Tamaño muestral calculado | Número de casos acVHC+ esperados |
|------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 3,0 | 4472 | 134 |
| 2,5 | 3746 | 94 |
| 2,0 | 3012 | 60 |
| 1,5 | 2270 | 34 |
| 1,0 | 1520 | 15 |
| 0,5 | 764 | 4 |

acVHC+: anticuerpos positivos frente al VHC.

3.- Prueba de Cribado: OraQuick HCV Rapid Antibody Test

Una vez seleccionados de forma aleatoria los sujetos candidatos a realizar la prueba de cribado, se procedió a su cita en el CS al que pertenecían. La cita se realizó vía telefónica. Previamente a la realización de la prueba de cribado todos los participantes recibieron información del proyecto y firmaron el consentimiento informado del mismo (**Anexo D**).

La prueba de cribado empleada para este estudio fue el *test* rápido para la detección de acVHC en saliva *OraQuick HCV Rapid Antibody Test*, un ensayo inmunocromatográfico de un solo uso, que permite detectar en sujetos mayores de 11 años, de forma cuantitativa y en diferentes muestras biológicas (saliva, sangre obtenida de una punción dactilar, suero o plasma), la presencia de anticuerpos (inmunoglobulinas G, IgG) frente a proteínas estructurales y no estructurales del VHC. La prueba tarda un total de 20 minutos en revelar el resultado y no requiere ningún equipamiento adicional.

El *test OraQuick HCV Rapid Antibody Test* se basa en el uso de una membrana de nitrocelulosa en la que se encuentran inmovilizados (i) péptidos sintéticos y antígenos recombinantes de las regiones virales del *core*, de NS3 y de NS4 (*T line*), con los que se analiza la presencia de acVHC+ y (ii) anticuerpos de cabra anti-IgG (*C line*), que actúan a modo de control de calidad de la prueba. La visualización de la reactividad de la prueba deriva de la unión de una suspensión de oro coloidal marcada con proteína A y las IgG presentes en la muestra que da lugar a la formación de una línea visible en la *T* y/o *C line* (**Figura 11**).

El *test* seleccionado como prueba de cribado ha sido aprobado por la FDA⁸² y posee, en saliva, una sensibilidad del 98,1% (95% IC: 96,9%-99,0%) y una especificidad del 99,6% (95% IC: 99,2%-99,9%). Además, esta prueba ha mostrado una baja reactividad cruzada frente a otros patógenos y una detección independiente del genotipo viral analizado²⁰⁷.

La realización de la prueba de cribado se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones proporcionadas por *OraSure Technologies Inc*²⁰⁸. Todo el personal investigador involucrado en el proyecto fue entrenado para la realización del *OraQuick HCV Rapid Antibody Test*. Antes de la realización del *test* se explicó a los participantes el procedimiento y requisitos a seguir. Todas las pruebas de cribado se realizaron en los

correspondientes CS y el resultado obtenido fue comunicado a los participantes *in situ* transcurridos 20 minutos desde la realización de las mismas.

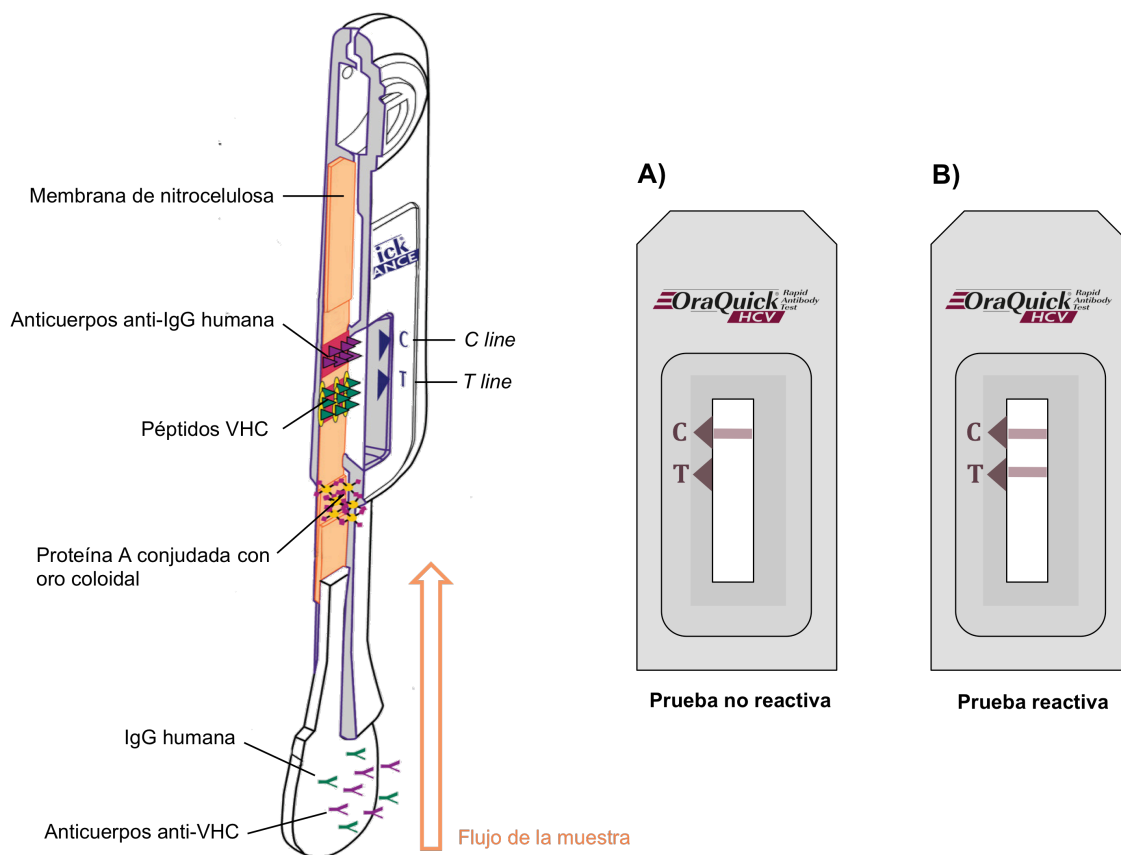


Figura 11. Esquema en el que se recoge el principio de detección de la prueba de cribado *OraQuick HCV Rapid Antibody Test*. Además se incluye la visualización de: A) una prueba de cribado no reactiva (negativa) y B) una prueba de cribado reactiva (positiva). IgG: Inmunoglobulina G; VHC: Virus de la Hepatitis C.

4.- Pruebas de diagnóstico: confirmación de los resultados positivos en la prueba de cribado

Todos aquellos participantes en los que la prueba de cribado arrojó un resultado positivo (prueba reactiva) fueron derivados al servicio de Servicio de Medicina Interna B de la XXIAC, en donde se procedió a la confirmación del mismo por medio de la realización de dos pruebas diagnósticas utilizadas en la práctica clínica diaria. Asimismo, el equipo de especialistas proporcionó charlas informativas sobre la prevención de la infección por VHC a dicho grupo de sujetos.

Las pruebas diagnósticas empleadas consistieron en un inmunoensayo para la detección de acVHC+ (*Anti-HCV II Cobas; Roche, Suiza*) y un ensayo de

cuantificación de la carga viral plasmática del VHC (*AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0*; Roche, Suiza). Ambos ensayos fueron llevados a cabo en muestras de plasma obtenidas a partir de sangre periférica total en tubos EDTA, la cual había sido extraída previamente a los participantes en las consultas del Servicio de Medicina Interna B de la XXIAC. Las pruebas serológicas frente al VHC, así como la cuantificación de la carga viral, fueron llevadas a cabo por especialistas del Servicio de Microbiología de la XXIAC.

5.- Seguimiento de los sujetos con pruebas de diagnóstico positivas

En aquellos participantes con una infección crónica por VHC confirmada por las pruebas de diagnóstico, se inició su seguimiento clínico en las consultas del Servicio de Medicina Interna B de la XXIAC. Dentro de éste, se procedió a la determinación del genotipo y subtipo viral (*Versant HCV Genotype 2.0 Assay Line Probe Assay, LiPA*; Siemens, Alemania), así como la realización de procedimientos diagnósticos adicionales tales como la evaluación de la dureza hepática por medio de ET (*FibroScan*).

Se inició tratamiento frente al VHC en todos aquellos pacientes que cumplieran los criterios de la guía española para el manejo de la Hepatitis C, en su actualización del 2016 y del PEAHC, en su versión de mayo de 2015^{42,209}.

En la **Figura 12** se recoge el diagrama del flujo de trabajo seguido durante las etapas del estudio de cribado.

6.- Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo con las variables sociodemográficas, epidemiológicas y virológicas de cada uno de los sujetos participantes en el estudio. Las variables cualitativas fueron expresadas como porcentaje (valor absoluto) y las cuantitativas como medias (\pm desviación estándar) o medianas [rango intercuartil].

Además, empleando los datos demográficos disponibles en el *Instituto Galego de Estatística (IGE)*, se realizó un análisis de inferencia para estimar la prevalencia de infección por VHC en personas nacidas entre 1960 y 1969, así como el número de casos no diagnosticados en la ciudad de A Coruña, en su área sanitaria y en Galicia. La estimación de estas variables fue expresada como número de casos o porcentaje y 95% de intervalo de confianza (95% IC).

El análisis estadístico y las estimaciones fueron realizadas por medio del programa epidemiológico *Epidat 4.2.* y bajo el asesoramiento de los profesionales del Departamento de Salud Pública de Galicia.

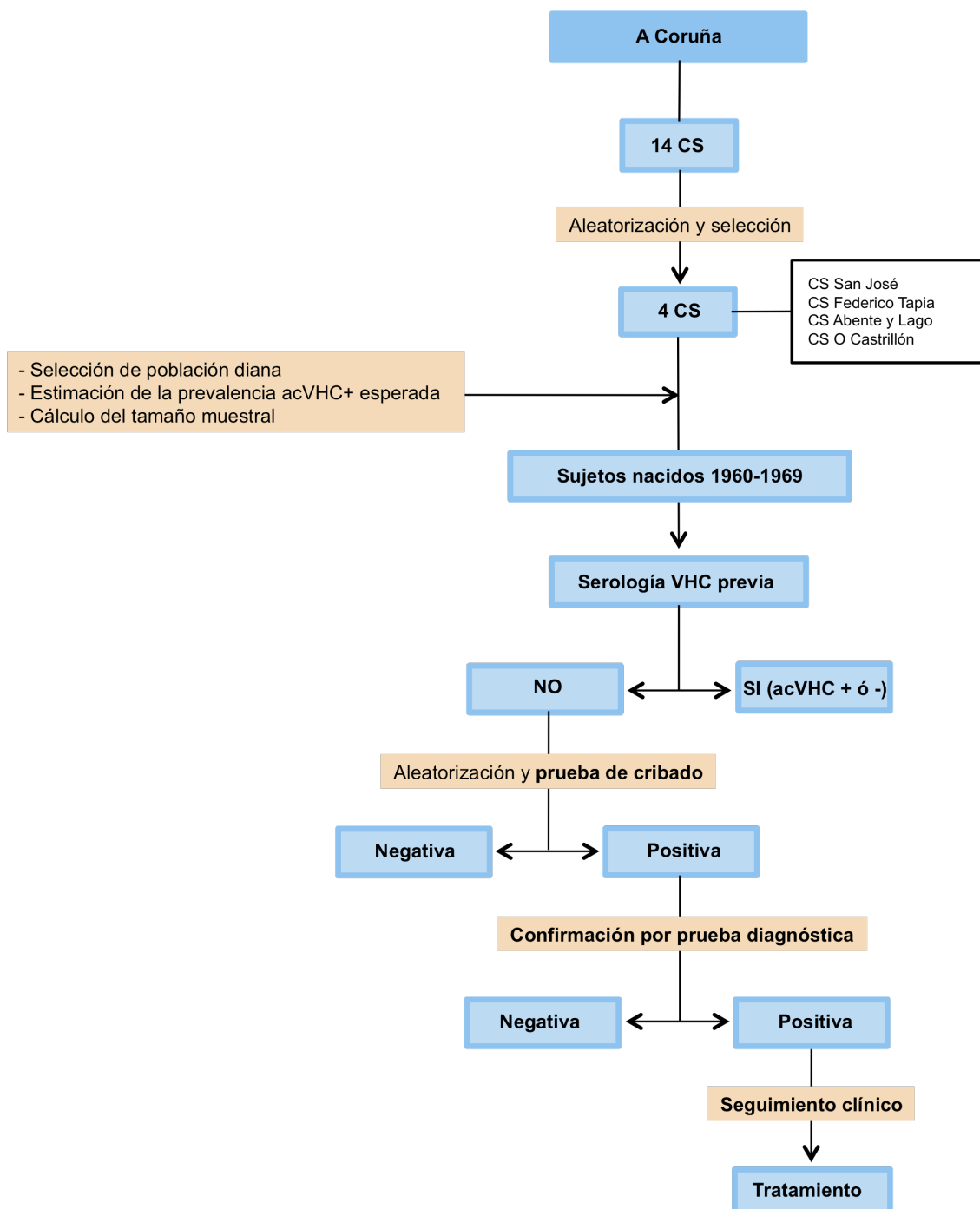


Figura 12. Diagrama del flujo de trabajo llevado a cabo para la realización del estudio de cribado de la infección por VHC en los cuatro centros de salud seleccionados. acVHC+: anticuerpos positivos frente al VHC; CS: centro de salud; VHC: Virus de la Hepatitis C.

VI.- RESULTADOS DEL OBJETIVO 1

1.- Características basales de la población de estudio

En el periodo de estudio se reclutaron un total de 367 pacientes mono infectados por VHC y co-infectados VIH-VHC, en seguimiento clínico en la *XXIAC/XXIF*. De éstos, 5 pacientes fueron excluidos al no presentar etnia caucásica y otros 10 en los que el haplogrupo de ADNmt no pudo ser determinado. Finalmente, el análisis fue llevado a cabo en 352 pacientes.

Las principales características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de la población de estudio aparecen recogidas en la **Tabla IX**. La mayor parte de la población estudiada fueron varones (73,6%, n=259), con una edad media de $49,5 \pm 9,1$ años. En referencia a la co-infección por VIH, más de la mitad de los pacientes del estudio (58,5%, n=206) presentaban co-infección con el virus del VIH, mientras que el 41,5% (n=146) eran pacientes mono infectados VHC.

A nivel de la infección por VHC, el tiempo medio de infección desde su diagnóstico hasta la muestra fue de $15,2 \pm 7,8$ años. La vía de transmisión más prevalente dentro de la cohorte fue la ADVP (69,9 %, n=246), seguida de un amplio porcentaje de pacientes con una vía de transmisión desconocida (22,7%, n=80). Las vías de transmisión sexual y nosocomial fueron minoritarias, representando tan solo un 7,3% (n= 26) de los casos. La mediana de la carga viral del VHC, en el momento de la realización del estudio, fue de 5,9 [5,6-6,5] logUI/mL. El 15,0% (n=53) de los pacientes habían sido previamente tratados frente al VHC (pegIFN+RBV). A nivel epidemiológico, se observaron diferencias significativas entre las dos subpoblaciones del estudio, pacientes mono infectados VHC y co-infectados VIH-VHC. Así, a nivel de la edad, los pacientes co-infectados presentaban edades inferiores a los mono infectados VHC (48,5 vs 52,0, respectivamente; p-valor = 0,016) y sin embargo, tiempos de infección por VHC mayores (12,2 vs 17,4 años, respectivamente; p-valor = 0,000). En cuanto a la distribución de las vías de transmisión del VHC, de forma global, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Así, se detectó una mayor prevalencia de la vía de transmisión sexual y ADVP en el grupo de los pacientes co-infectados (4,8% vs 0,0% y 89,4% vs 42,5%, respectivamente).

En relación al genotipo viral del VHC, el 98,9% (n=348) de los pacientes tenían determinado el genotipo viral. Dentro de éstos, el genotipo-subtipo mayoritario fue el G1a (39,1%, n=136), seguido del G1b (20,7%, n=72), del G3 (19,0%, n=66) y del G4 (15,2%, n=53). Por su parte, el G2 resultó minoritario en la cohorte de pacientes, representando tan solo el 2,0% (n=7) de los casos. Un 4,0% (n=14) de los pacientes

con G1, no tenían determinado el subtipo viral. A nivel de la distribución de los genotipos y subtipos virales, se observaron diferencias significativas entre el grupo de pacientes VHC mono infectado y VIH-VHC co-infectado (p-valor=0.000). Se identificaron mayores prevalencias de G3 y G4 en el grupo de pacientes co-infectados VIH-VHC, en comparación con el grupo de pacientes mono infectados VHC (23,6% vs 12,4%, 19,7% vs 8,9%, respectivamente).

Tabla IX. Características sociodemográficas epidemiológicas, clínicas y virológicas de la población de estudio.

| | Global (n=352) | Mono infectados VHC (n=146) | Co- infectados VIH-VHC (n=206) | p-valor |
|---------------------------------------|----------------------|--------------------------------|---|--------------|
| Edad (años) | 49,5 ±9,1 | 52,0±12,1 | 48,5±5,9 | 0,016 |
| Género (varón) | 73,6 (259) | 71,2 (104) | 75,2 (155) | 0,707 |
| Tiempo de infección por VHC (años) | 15,2±7,8 | 12,2±8,0 | 17,4±6,9 | 0,000 |
| Vía de transmisión del VHC | | | | 0,000 |
| ADVP | 69,9 (246) | 42,5 (62) | 89,4 (184) | |
| Sexual | 2,8 (10) | 0 (0) | 4,8 (10) | |
| Nosocomial | 4,5 (16) | (70) | 4,8 (10) | |
| Desconocida | 22,7 (80) | (14) | 1 (2) | |
| CV VHC (logUI/mL) muestra | 5,9 [5,6-6,5] | 5,9 [5,7-6,5] | 6,0 [5,6-6,5] | 0,852 |
| Tratamiento previo frente VHC | 15,5 (53) | 22,6 (33) | 9,7 (20) | 0,004 |
| Genotipo VHC (n=348) | | | | 0,000 |
| G1a | 39,1 (136) | 41,5 (60) | 37,5 (76) | |
| G1b | 20,7 (72) | 30,4 (44) | 13,8 (28) | |
| G1 no subtipado | 4,0 (14) | 3,4 (5) | 4,4 (9) | |
| G2 | 2,0 (7) | 3,4 (5) | 1 (2) | |
| G3 | 19,0 (66) | 12,4 (18) | 23,6 (48) | |
| G4 | 15,2 (53) | 8,9 (13) | 19,7 (40) | |
| Dureza hepática (FibroScan, kPa) | 8,8 [6,3-14,6] | 9,0 [6,8-13,3] | 8,5 [6,1-15,3] | 0,434 |
| Fibrosis hepática METAVIR (n=307) | | | | 0,281 |
| F0-F1 (<7,6 kPa) | 38,1 (117) | 31,0 (45) | 35,4 (72) | |
| F2 (7,7-9,4 kPa) | 17,9 (55) | 17,9 (26) | 14,3 (29) | |
| F3 (9,5-12,5 kPa) | 14,3 (44) | 16,5 (24) | 9,8 (20) | |
| F4 (>12,5 kPa) | 29,6 (91) | 26,2 (38) | 26,1 (53) | |
| Descompensaciones hepáticas | 4,0 (14) | 3,4 (5) | 4,4 (9) | 0,853 |
| AST (UI/mL) muestra | 41,0 [29,0–65,0] | 39,0 [29,0–65,0] | 42,0 [30,0–67,0] | 0,437 |
| ALT (UI/mL) muestra | 49,0 [32,0–85,0] | 52,0 [29,0–89,0] | 47,0 [32,0–81,0] | 0,681 |
| GGT (UI/mL) muestra | 62,0 [34,0–116,0] | 53,0 [27,0–104,0] | 69,0 [40,0–135,0] | 0,001 |

Los datos de la tabla están expresados como media ± desviación típica, mediana [rango-intercuartílico], % (n). Los p-valores significativos aparecen resaltados en negrita. ADVP: Adictos a drogas por vía parenteral; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; CV VHC: carga viral del VHC; G1a: subtipo del VHC 1a; G1b: subtipo del VHC 1b; G2: genotipo del VHC 2; G3: genotipo del VHC 3; G4: genotipo del VHC 4; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; kPa: kiloPascal; UI/mL: Unidades internacionales por mililitro; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; VHC: Virus de la Hepatitis C.

En cuanto al estado clínico de la infección por VHC, ésta fue evaluada en base a los valores de las enzimas AST, ALT y GGT, así como al valor de dureza hepática del *FibroScan* disponible y a la presencia de descompensaciones hepáticas previas a la toma de la muestra.

La mediana de las enzimas AST, ALT y gamma glutamil transpeptidasa (GGT) fue de 41,0 [29,0-65,0] UI/mL , 49,0 [32,0-85,0] UI/mL y 62,0 [34,0-116,0] UI/mL, respectivamente. La única enzima que arrojó diferencias significativas entre ambas poblaciones del estudio, fueron los niveles de GGT, siendo más elevados en el grupo de los pacientes con co-infección VIH-VHC (69,0 vs 53,0 UI/mL respectivamente; p-valor = 0,001).

La fibrosis hepática, evaluada en base a la dureza hepática del *FibroScan*, pudo ser analizada en el 87,2% (n=307) de los pacientes del estudio. La mediana de *FibroScan* fue 8,8 [6,3-14,6] kPa y resultó ser similar entre el grupo de pacientes VHC monoinfectados y el grupo de co-infectados VIH-VHC (9,0 vs 8,5 kPa respectivamente, p-valor = 0,434). La recodificación de la dureza hepática en grado de fibrosis según la escala METAVIR, mostró que más de la mitad de los pacientes del estudio (56,0%, n=172) presentaba niveles leves-moderados de fibrosis hepática (F0-F2), un 14,% (n=44) un grado de fibrosis avanzado (F3) y un 29,6% (n=91) cirrosis hepática (F4). Atendiendo a las recomendaciones propuestas por el PEAHC de mayo de 2015, sobre la priorización de los AADs en función del grado de fibrosis hepática, un 38,1% (n=117) de los pacientes del estudio no recibirían tratamiento frente al VHC basado en combinaciones con AADs, debido a su bajo grado de fibrosis (F0-F1). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la distribución de la fibrosis hepática, a nivel global, entre las poblaciones de pacientes monoinfectados VHC y co-infectados VIH-VHC (p-valor=0,434).

En relación a la presencia de descompensaciones hepáticas, tan sólo un 4,0% (n=14) presentaba o había presentado algún tipo de descompensación hepática (hemorragia por varices esofágicas, ascitis, encefalopatía o alguna combinación de las tres).

Además de comprobarse que las dos subpoblaciones de pacientes eran homogéneas en cuanto a la fibrosis hepática, tanto a nivel de *FibroScan* como a nivel de escala METAVIR, se realizó un análisis comparativo de la mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por VHC hasta el momento actual en los diferentes grados de fibrosis hepática (F0- F1, F2, F3 y F4) y un análisis de correlación entre el tiempo de infección por VHC y el valor de *FibroScan* observado. Ambos

análisis resultaron no significativos (p-valor =0,484; Rh de Spearman=0,070, p-valor = 0,225).

Debido a que las subpoblaciones del estudio fueron homogéneas a nivel del grado de fibrosis (se ha descrito que los pacientes co-infectados VIH-VHC tienden a tener valores de fibrosis hepática más elevados) y que, al menos en nuestra cohorte, el tiempo de infección por VHC parece no influir en el estadio de fibrosis, ambos grupos de pacientes pudieron ser analizados conjuntamente y permitieron deducir que las diferencias en el grado de fibrosis podrían ser atribuidas a otras variables como los haplogrupos de ADNmt.

El estado de la infección por VIH en los pacientes co-infectados, en el momento de la muestra, aparece recogido en la **Tabla X**. De forma global, la mediana de recuento de linfocitos T CD4+ fue de 538 [304-770] células/μL. Además, el 10,7% (n=22) presentaba recuentos de linfocitos T CD4+ inferiores a 200 células/μL. En referencia al tratamiento antirretroviral (TAR), el 97,1% de los pacientes (n=200) estaba bajo TAR en el momento de la muestra y un 89,0% (n=178) de estos pacientes presentaba viremias del VIH inferiores a 50 cop/mL.

Tabla X. Estado de la infección por VIH en los pacientes co-infectados VIH-VHC.

| | Pacientes co-infectados VIH-VHC (n=206) |
|---|--|
| Recuento de linfocitos T CD4+ en la muestra (cél/μL) | 538 [304-770] |
| Recuento de linfocitos T CD4+ <200 cél/μL en la muestra | 10,7 (22) |
| TAR en el momento de la muestra | 97,1 (200) |
| CV VIH en la muestra (<50 cop/mL) | 89,0 (178) |

Los datos de la tabla están expresados como mediana [rango-intercuartílico], % (n). Cél/μL: células por microlitro; Cop/mL: copias por mililitro; CV VIH: carga viral del VIH; TAR: Tratamiento antirretroviral; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; VHC: Virus de la Hepatitis C.

2.- Prevalencia de los haplogrupos de ADN mitocondrial

La distribución de la prevalencia de los haplogrupos de ADNmt en la población de estudio aparece recogida en la **Figura 13-A**.

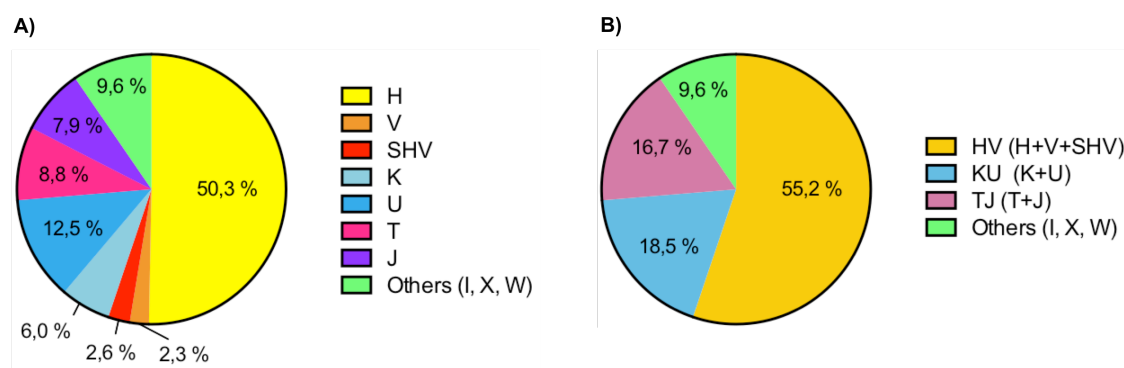


Figura 13. Distribución de la prevalencia de los haplogrupos de ADN mitocondrial en la población de estudio (n=352). A) Distribución de la prevalencia de los principales haplogrupos de ADN mitocondrial; B) Distribución de la prevalencia de los *cluster* de haplogrupos de ADN mitocondrial en función de sus relaciones filogenéticas.

El haplogrupo de ADNmt más prevalente fue el haplogrupo H (50,3%, n=177), seguido de los haplogrupo U (12,5%, n=44), T (8,8%, n=31), J (7,9%, n=28) y K (6,0% , n=21). El haplogrupo V, dentro de los seis haplogrupos mitocondriales europeos más comunes, fue el de menor prevalencia (2,3%, n=8). El *cluster* Others, que incluye a los tres haplogrupos minoritarios I, W, X, presentó una prevalencia del 9,6% (n=34). La prevalencia del haplogrupo minoritario SHV fue del 2,6% (n=9).

Para la realización de los análisis estadísticos posteriores, los diferentes haplogrupos fueron agrupados, en base a sus relaciones filogenéticas¹⁵³, en varios *clusters* (haplogrupos que comparten un mismo origen filogenético y que a la vez poseen mutaciones hereditarias que les otorgan unas características diferenciadoras): HV (incluye los haplogrupos H, V, SHV), KU, TJ y Others (I,W,X). Este sistema de *clusterización* reduce la pérdida de potencia estadística derivada de la comparación de un gran número de grupos con tamaños muestrales muy dispares (grupos mayoritarios vs grupos minoritarios).

Teniendo en cuenta la clusterización anteriormente indicada, la distribución de los haplogrupos en los diferentes *clusters* fue la siguiente: HV (55,2%, n=194); KU (18,5%, n=65); TJ (16,7%, n=59) y Others (9,6%, n= 34) (**Figura 13-B**).

3.- Relación de los haplogrupos de ADN mitocondrial con el desarrollo y progresión de la infección por VHC

El estudio de la relación de los *clusters* de haplogrupos de ADNmt con variables implicadas, de forma directa o indirecta, en el desarrollo y progresión de la infección

por VHC, no arrojó diferencias significativas a nivel de las principales variables sociodemográficas y epidemiológicas tales como: la edad de los pacientes (p-valor = 0,750); el género (p-valor = 0,550) o la vía de transmisión del VHC (p-valor = 0,800).

En lo relativo a los valores analíticos y virológicos, tampoco se observaron asociaciones significativas entre los diferentes *clusters* de haplogrupos de ADNmt y los niveles de AST (p-valor = 0,621), ALT (p-valor = 0,804), GGT (p-valor = 0,428) o el recuento de linfocitos T CD4+ en el grupo de pacientes co-infectados VIH-VHC (p-valor=0,866). Por su parte, la carga viral del VHC en el momento de la muestra, tampoco presentó ningún tipo de relación con los diferentes *clusters* de haplogrupos (p-valor=0,254).

El genotipo viral del VHC, los niveles de fibrosis hepática y la presencia de cirrosis, fueron las únicas variables analizadas que mostraron una tendencia clara en los diferentes *cluster* de haplogrupos de ADNmt.

4.- Relación de los haplogrupos de ADN mitocondrial con el genotipo viral del VHC

En la **Figura 14**, se representa la distribución de la prevalencia de los principales genotipos del VHC identificados en el estudio (G1, G3 y G4) en relación a los *clusters* de haplogrupos de ADNmt.

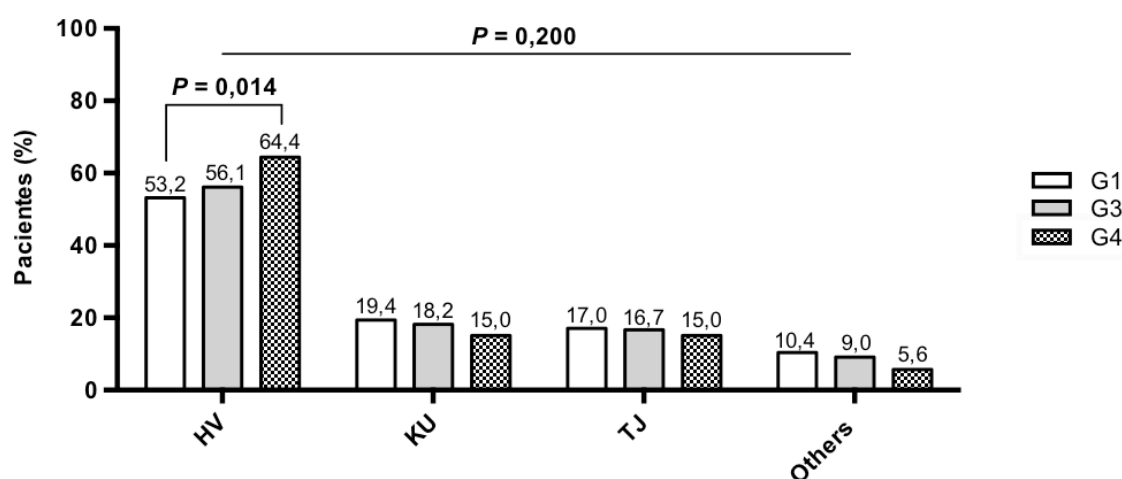


Figura 14. Distribución de los principales genotipos virales del VHC en los diferentes *clusters* de haplogrupos de ADN mitocondrial. G1: genotipo del VHC 1; G3: genotipo del VHC 3; G4: genotipo del VHC 4; *P*: p-valor.

A pesar de que globalmente no se observaron diferencias significativas en la distribución de los diferentes genotipos virales en función de los *clusters* de haplogrupos de ADNmt (p-valor =0,200), si se observó una alta prevalencia de pacientes infectados con G4 el *cluster* HV (64,4%). Esta prevalencia de G4 en el *cluster* HV fue significativa cuando se comparó con la de los pacientes infectados por G1 de ese mismo *cluster* (64,4% vs 53,2%, respectivamente; p-valor = 0,014).

5.- Relación de los haplogrupos de ADN mitocondrial con los niveles de fibrosis hepática

Los haplogrupos de ADNmt mostraron una asociación con el grado de fibrosis hepática. En la **Figura 15** se recoge la mediana de los niveles de dureza hepática en kPa, en función de los diferentes haplogrupos de ADNmt. A pesar de que no se observaron diferencias significativas a nivel global (p-valor = 0,272), los pacientes pertenecientes al haplogrupo mitocondrial V y al *cluster* de haplogrupos minoritarios *Others*, presentaron los valores de dureza hepática más elevados (16,1 y 11,3 kPa respectivamente).

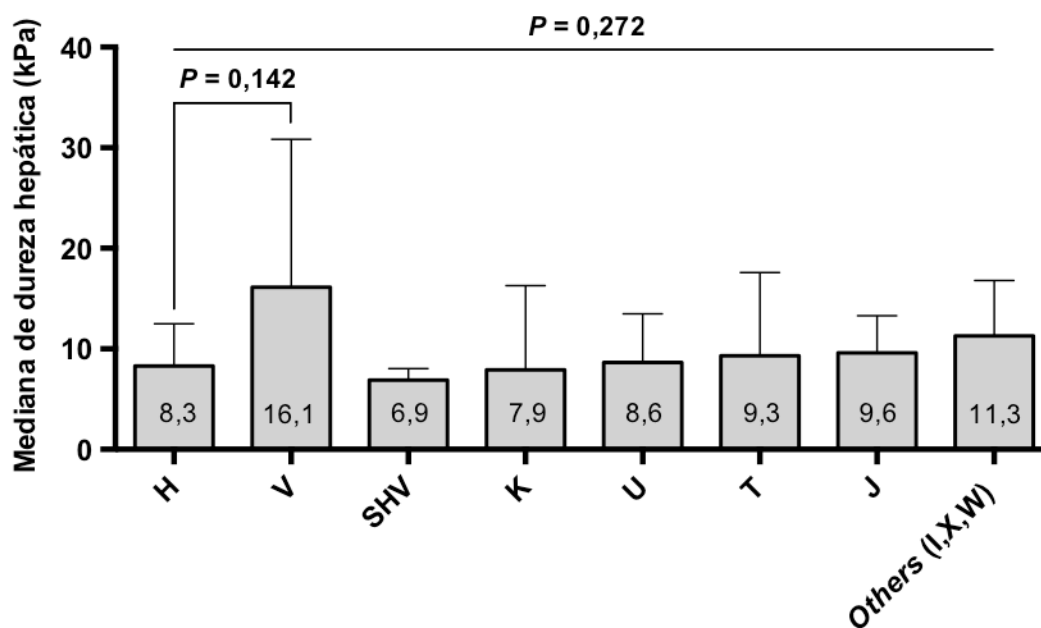


Figura 15. Distribución de la dureza hepática (kPa) en de los pacientes del estudio en función del haplogrupo de ADN mitocondrial. Los datos se expresan como mediana-tercer cuartil. kPa: kiloPascales; P: p-valor.

Además de lo indicado anteriormente y, en base a los valores observados, todos los haplogrupos de un mismo *cluster* mostraron valores similares de dureza hepática, a excepción del haplogrupo V, el cual, dentro del *cluster* HV, destacó por su elevada

mediana de dureza hepática [16,1 [7,3-30,8] kPa] en comparación con los haplogrupo H y SHV [8,1 [6,2-8,3] kPa] de ese mismo *cluster* (p-valor=0,142). Teniendo en cuenta este comportamiento del haplogrupo V en cuanto a la dureza hepática, los subsecuentes análisis de la misma excluyeron este haplogrupo del *cluster* HV.

La evaluación del impacto de los *clusters* de haplogrupos de ADNmt en la fibrosis hepática mostró resultados similares a los observados en base a los valores de dureza hepática. Así, tras transformar los mismos a escala METAVIR y clasificar los niveles de fibrosis en leve (F0-F2) y avanzada (F3-F4), se observó que, del total de pacientes con un grado de fibrosis leve, el 55,8% de los mismos (96/172) pertenecían al *cluster* H + SHV. Por su parte, más de la mitad de los pacientes de los *clusters* TJ y *Others* + V, presentaban estadios avanzados de la fibrosis (53,1% y 57,9% respectivamente) (**Figura 16**). A pesar de lo indicado, las diferencias ,a nivel global, de la distribución de los *clusters* de haplogrupos en función del estadio leve o avanzado de la fibrosis hepática, no fueron significativas (p-valor = 0,088).

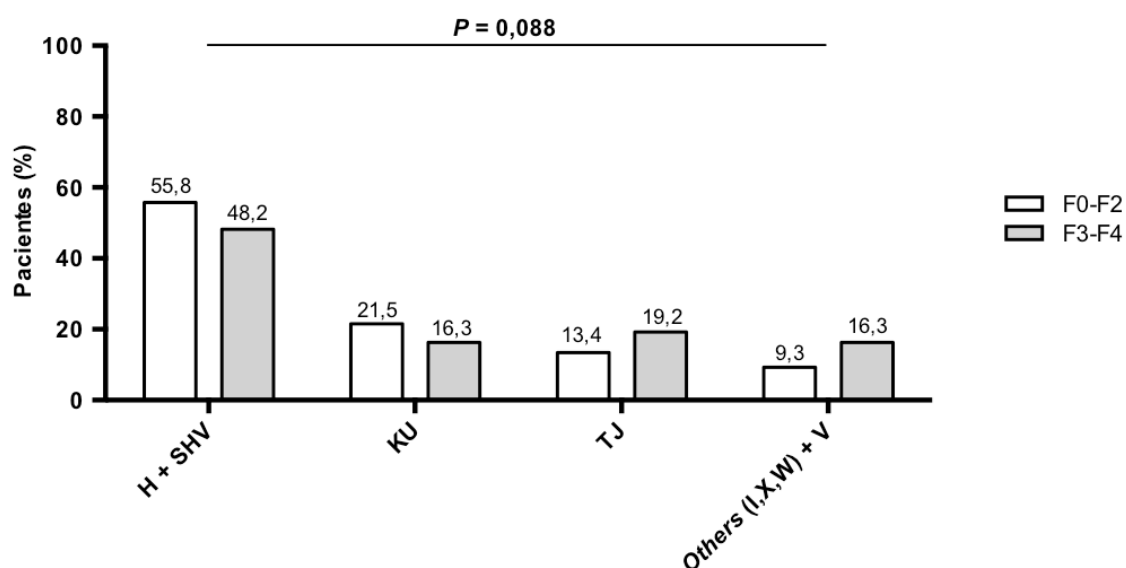


Figura 16. Distribución del grado de fibrosis en escala METAVIR, entre los diferentes *clusters* de haplogrupos de ADN mitocondrial. F0-F2: fibrosis leve; F3-F4: fibrosis avanzada, cirrosis; P: p-valor.

6.- Relación de los haplogrupos de ADN mitocondrial con el desarrollo de cirrosis hepática

Además de asociarse con los niveles de fibrosis hepática, los *clusters* de haplogrupos de ADNmt presentaron relación con la cirrosis hepática (**Figura 17**). La

presencia de cirrosis hepática se definió como valores de *FibroScan* superiores a 12,5 kPa (F4 según la escala METAVIR).

Considerando el mismo tiempo de diagnóstico, se observó una alta prevalencia de cirrosis hepática en los pacientes pertenecientes al haplogrupo V y al *cluster* de haplogrupos minoritarios *Others*, en comparación con aquellos pacientes pertenecientes al *cluster* de haplogrupos H y SHV (47,4% vs 25,3% respectivamente; p-valor = 0,009).

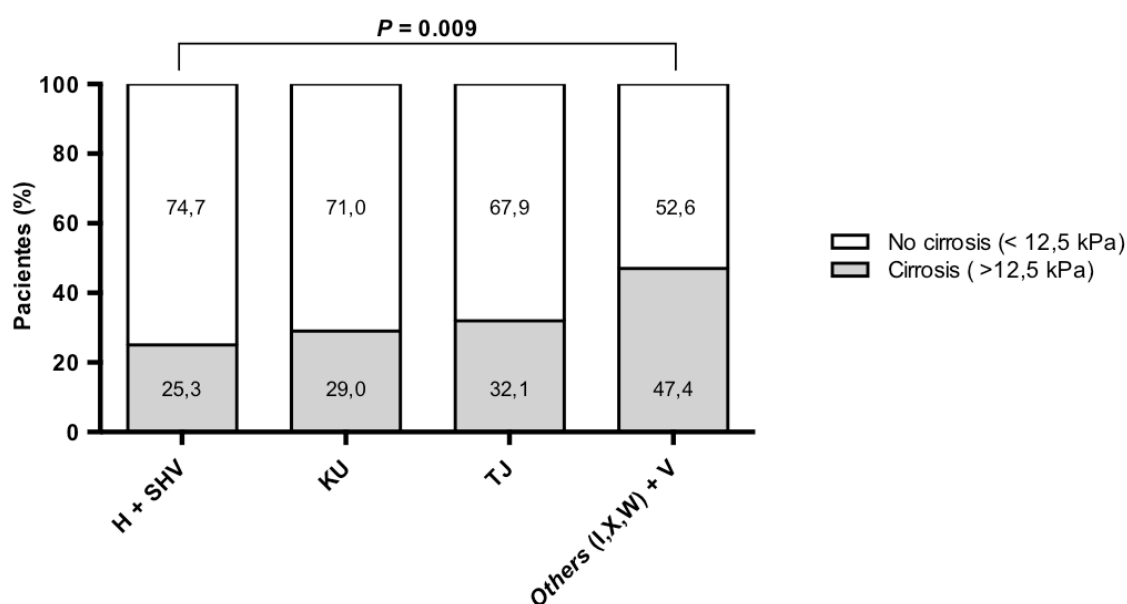


Figura 17. Distribución de la cirrosis hepática, definida como valores de dureza hepática superiores a 12,5 kPa, entre los diferentes *clusters* de haplogrupos de ADN mitocondrial. kPa: kilopascal; *P*: p-valor.

Con el fin de evitar el sesgo derivado de posibles variables confusoras e identificar factores asociados con la cirrosis hepática, se realizó un análisis multivariante de regresión logística. El análisis fue ajustado por edad, género, tiempo (en años) transcurrido desde el diagnóstico de la infección por VHC y genotipo viral del VHC. Dado sus altas prevalencias, se empleó el *cluster* de haplogrupos H + SHV y el genotipo 1 del VHC como categorías de referencia para el análisis comparativo de los diferentes *clusters* y genotipos virales del VHC, respectivamente.

El análisis multivariante (**Figura 18**) mostró que, considerando el mismo tiempo de diagnóstico de la infección por VHC, el haplogrupo V y el *cluster* de haplogrupos minoritarios *Others* fueron identificados como un factor de riesgo para el desarrollo de cirrosis hepática en comparación con el *cluster* HV, con un *odds ratio* (OR) = 2,429;

[95% IC (1,086-5,433), p-valor = 0,031]. Por su parte, el genotipo 4 del VHC se asoció con una menor probabilidad de desarrollo de cirrosis hepática en comparación con el genotipo 1 [OR = 3,63; 95% IC (0,149-0,884), p-valor = 0,026]. La edad avanzada se identificó como un factor de riesgo para el desarrollo de cirrosis hepática [OR = 1,076; 95% IC (0,104-1,113), p-valor = 0,000].

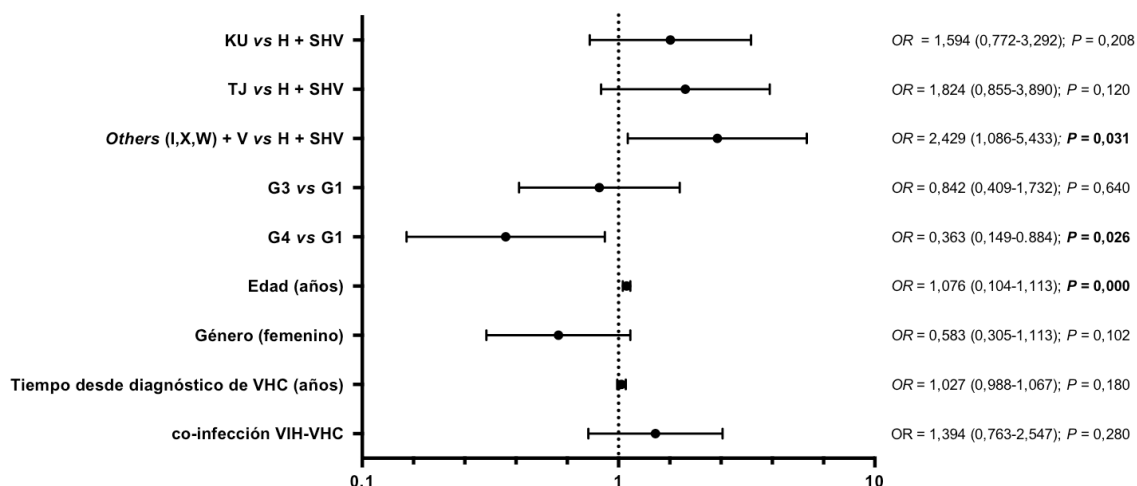


Figura 18. Diagrama de bosque con los factores asociados a la presencia de cirrosis hepática (>12,5 kPa). Los datos aparecen reflejados como *odds ratio*, intervalo de confianza al 95%, p-valor. Los p-valores significativos aparecen resaltados en negrita. G1: genotipo del VHC 1; G3: genotipo del VHC 3; G4: genotipo del VHC 4; OR: *odds ratio*; P: p-valor; VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana; VHC: Virus de la Hepatitis C.

VII.- RESULTADOS DEL OBJETIVO 2

1.- Características basales de la población de estudio

Se recogieron un total de 11 pacientes con infección crónica por VHC, en seguimiento clínico del Servicio de Medicina Interna B de la XX/AC que iniciaron tratamiento frente al VHC, basado en terapias libres de IFN, en el periodo marzo de 2014-junio de 2015.

Las principales características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas previas al inicio del tratamiento frente al VHC de la población de estudio aparecen recogidas en la **Tabla XI**. Además, en el **ANEXO E**, se recogen estas mismas características, para cada uno de los pacientes del estudio.

Tabla XI. Características sociodemográficas epidemiológicas, clínicas y virológicas basales de la población de estudio.

| | Población (n=11) |
|--|---------------------|
| Edad (años) | 57,9 ± 12,5 |
| Género (varón) | 54,5 (6) |
| Tiempo de infección por VHC (años) | 14,0±4,3 |
| Vía de transmisión del VHC | |
| ADVP | 72,7 (8) |
| Desconocida | 27,3 (3) |
| Subtipo del VHC | |
| G1a | 18,2 (2) |
| G1b | 72,7 (8) |
| G3a | 9,1 (1) |
| Dureza hepática (<i>FibroScan</i> , kPa) | 18,2 [14,3-30,3] |
| Fibrosis hepática | |
| F3 (9,5-12,5 kPa) | 9,1 (1) |
| F4 (>12,5 kPa) | 90,9 (10) |
| Descompensaciones hepáticas | 27,3 (3) |
| AST (UI/mL) previa al inicio del tratamiento | 102,0 [44,7–138,0] |
| ALT (UI/mL) previa al inicio del tratamiento | 92,0 [49,5–203,2] |
| GGT (UI/mL) previa al inicio del tratamiento | 88,0 [56,7,0–106,2] |
| Co-infección VIH-VHC | 18,2 (2) |

Los datos de la tabla están expresados como media ± desviación típica, mediana [rango-intercuartílico], % (n). ADVP: Adictos a drogas por vía parenteral; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; kPa: kiloPascal; G1a: subtipo del VHC 1a; G1b: subtipo del VHC 1b; G3a: subtipo del VHC 3a; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; UI/mL: Unidades internacionales por mililitro; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; VHC: Virus de la Hepatitis C.

Más de la mitad de los pacientes del estudio fueron varones (54,5%, n=6), con una edad media de 57,9 ± 12,5 años. Todos los sujetos participantes en el estudio presentaron nacionalidad española y raza caucásica. En referencia a la infección por VHC, el tiempo medio de infección de la misma, desde su diagnóstico hasta el inicio del tratamiento, fue de 14,0±4,3 años. Se observó una alta prevalencia de una vía de transmisión desconocida (72,7% , n=8), mientras que el 27,3% (n=3) restante de los pacientes presentó una vía de transmisión asociada a ADVP. El subtipo viral del VHC

más prevalente fue el 1b [72,7% (n=8)], seguido del subtipo 1a (18,2%, n=2) y el subtipo 3a (9,1%, n=1).

En cuanto al estado clínico de la infección por VHC, ésta fue evaluada en base a los valores, previos al inicio del tratamiento frente al VHC, de las enzimas AST, ALT y GGT, así como a la mediana de la dureza hepática del *FibroScan* y a la presencia de descompensaciones hepáticas.

En este sentido, la mediana de las enzimas AST, ALT y GGT fue de 102,0 [44,7-138,0] UI/mL, 92,0 [49,5-203,2] UI/mL y 88,0 [56,7-106,2] UI/mL, respectivamente. En cuanto a la fibrosis hepática, la mediana de la dureza hepática previa al inicio del tratamiento fue de 18,2 [14,3-30,3] kPa. Una alta proporción de pacientes [90,9% (n=10)] presentaron cirrosis hepática, definida como valores de dureza hepática >12,5 kPa. Tan solo un paciente (9,1%, n=1) presentó un grado avanzado de fibrosis sin llegar a ser cirrótico (8,3 kPa, F3). En relación a la presencia de descompensaciones hepáticas, el 27,3% (n=3) de los pacientes presentaba o había presentado algún tipo de descompensación hepática. De éstos, 2 de ellos tenían ascitis y uno hemorragia por varices esofágicas.

En relación a la co-infección por VIH, ésta fue baja (18,2%, n = 2). Los dos pacientes co-infectados VIH-VHC presentaban un subtipo viral 1a y una vía de transmisión de asociada a ADVP. En cuanto al estado de la infección por VIH, ambos pacientes estaban bajo TAR y presentaban, en el momento del inicio del tratamiento frente al VHC, viremias del VIH inferiores a 50 cop/mL, así como una media de recuento de linfocitos T CD4+ de 550 ± 100 células/μL. Los dos pacientes co-infectados VIH-VHC presentaban cirrosis hepática.

2.- Tratamiento antiviral frente al VHC y dinámica viral del VHC

2.1.- Tratamiento antiviral frente al VHC

En términos del tratamiento frente al VHC, las principales características basales de la población, así como las combinaciones empleadas en el estudio, aparecen recogidas en la **Tabla XII**. Además, en el **ANEXO E**, se recogen estas mismas características para cada uno de los pacientes del estudio.

En relación al tratamiento previo frente al VHC, tan sólo el 27,3% (n=3) de los pacientes del estudio eran naïve a tratamiento frente al VHC, mientras que el 72,7% (n=8) restante habían estado expuestos previamente a terapias frente al VHC. De

éstos, el 75% (n=6) habían recibido regímenes basados en pegIFN + RBV y el 25,0% (n=2) tratamientos basados en la combinación de pegIFN + RBV e inhibidores de proteasa de primera generación. Las características de respuesta a estos tratamientos previos fueron las siguientes: el 25,0% (n=2) fueron pacientes *relapsers*; el 62,5% (n=5) respondedores parciales y el 12,5% (n=1) respondedores nulos.

Tabla XII. Características basales de la población de estudio en relación al tratamiento previo del VHC y combinaciones terapéuticas empleadas en el estudio.

| | Población (n=11) |
|---|------------------|
| Exposición previa a tratamiento frente al VHC | 72,7 (8) |
| Tipo de tratamiento previo | |
| pegIFN+RBV | 75,0 (6) |
| pegIFN+RBV + IP 1ª generación | 25,0 (2) |
| Tipo de respuesta al tratamiento previo | |
| <i>Relapsed</i> | 25 (2) |
| Respondedor parcial | 62,5 (5) |
| Respondedor nulo | 12,5 (1) |
| Pauta de tratamiento en el estudio | |
| SOF+SMV | 36,4 (4) |
| SOF+ DCV | 27,3 (3) |
| 2D | 9,1 (1) |
| 3D | 18,2 (2) |
| SOF | 9,1 (1) |
| RBV | 100,0 (11) |
| Duración del tratamiento | |
| 12 semanas | 63,6 (7) |
| 24 semanas | 36,4 (4) |

Los datos de la tabla están expresados como % (n). DCV: daclatasvir; IP: inhibidor de proteasa (NS3/4A); pegIFN: interferón pegilado; RBV: ribavirina; SMV: simeprevir; SOF: sofosbuvir; VHC: Virus de la Hepatitis C; 2D: ombitasvir + paritaprevir potenciado con ritonavir; 3D: ombitasvir + paritaprevir potenciado con ritonavir + dasabuvir.

En cuanto a las pautas de tratamiento evaluadas en el estudio, las principales regímenes se basaron en el uso del inhibidor de NS5B sofosbuvir (SOF) combinado con el inhibidor de NS3/4A simeprevir (SMV) o con el inhibidor de NS5A daclatasvir (DCV) [36,4%, (n=4) y 27,3% (n=3), respectivamente]. Además, el 27,3% (n=3) de los pacientes fueron tratados con regímenes basados en el uso combinado del inhibidor de NS5A ombitasvir y el inhibidor de NS3/4A paritaprevir potenciado con ritonavir, solos (2D) (9,1%, n=1) o junto con el inhibidor de NS5B dasabuvir (3D) (18,2%, n=2). Tan sólo un paciente (9,1%) fue tratado con una única familia de AADs (SOF). Todos los tratamientos del estudio incluyeron RBV.

En relación a la duración del tratamiento, el 63,6% (n=7) de los pacientes fueron tratados durante 12 semanas, mientras que el 36,4% (n=4) restante lo hicieron durante 24 semanas.

2.2.- Dinámica viral del VHC durante el tratamiento

La dinámica viral del VHC de cada uno de los pacientes del estudio durante el tratamiento aparece recogida en la **Figura 19**.

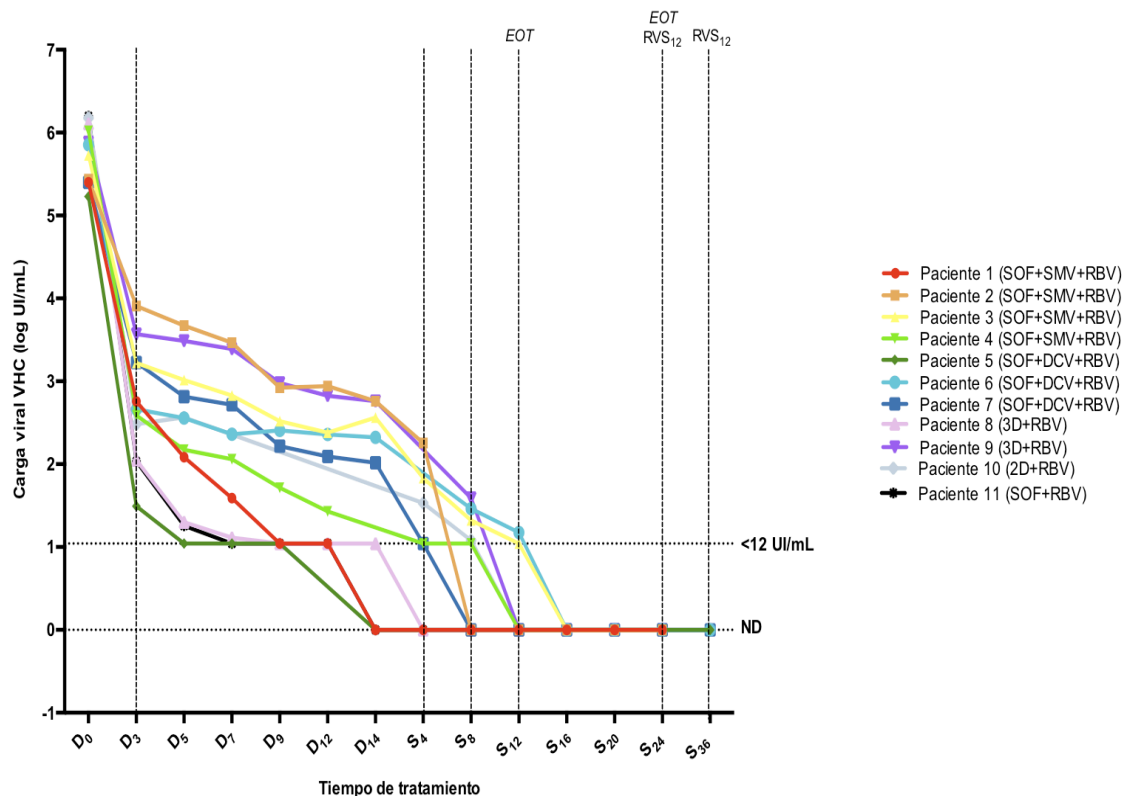


Figura 19. Dinámica viral del VHC de cada uno de los pacientes del estudio a lo largo del periodo de tratamiento y postratamiento. La carga viral del VHC aparece reflejada como logUI/mL. Con líneas punteadas en el eje de las abscisas se recogen los principales puntos analizados durante el estudio de la cinética viral: D₃, carga viral tras 3 días desde el inicio del tratamiento; S₄, carga viral tras 4 semanas de tratamiento; S₈, carga viral tras 8 semanas de tratamiento; EOT, carga viral al finalizar el tratamiento, RVS₁₂: carga viral tras doce semanas una vez finalizado el tratamiento. Las líneas punteadas en el eje de las ordenadas, representan: <12UI/mL, carga viral detectable no cuantificable y ND, carga viral no detectable. D: día; DCV: daclatasvir; EOT: *end of treatment*; ND: carga viral no detectable; RBV: ribavirina; RVS₁₂: Respuesta viral sostenida a semana 12; S: semana SMV: simeprevir; SOF: sofosbuvir; UI/mL: unidades internacionales por mililitro; VHC: Virus de la Hepatitis C; 2D: ombitasvir + paritaprevir potenciado con ritonavir; 3D: ombitasvir + paritaprevir potenciado con ritonavir + dasabuvir.

De forma global, la mediana de la carga viral en el momento previo al inicio del tratamiento (basal o D₀) fue de 5,8 [5,4-6,1] log UI/mL. A pesar del escaso tamaño

muestral, no se observó ninguna tendencia clara entre la carga viral del VHC a nivel basal y ciertas características del paciente, tales como el genotipo viral del VHC, la exposición previa al tratamiento frente al VHC, la presencia de cirrosis o descompensaciones hepáticas y la co-infección VIH-VHC.

Una vez iniciado el tratamiento, se observó un fuerte descenso de la carga viral del VHC tras tres días desde el inicio del mismo (D_3). Así, de forma global, la carga viral descendió, en mediana, 3,2 [2,3-3,7] log UI/mL. Este descenso supone una reducción relativa de la carga viral basal de más del 99,0%. Esta reducción se observó en el 90,9% ($n=10$) de los pacientes. La mediana de carga viral a D_3 fue de 460 [112-1680] UI/mL. En lo que respecta a la dinámica viral del VHC en tiempos más largos de tratamiento, se observó que la reducción de la carga viral a semana 4 (S_4) y 8 (S_8) fue de 4,8 [4,0-5,9] logUI/mL y de 5,1 [4,4-5,4] logUI/mL respectivamente. Además, a S_4 , el 90,9% ($n=10$) de los pacientes presentaba cargas virales del VHC inferiores a 100 UI/mL y, a S_8 , todos los pacientes del estudio presentaban cargas virales del VHC inferiores a 50 UI/mL.

En este punto y, pese al escaso tamaño muestral y heterogeneidad de los pacientes que impidieron la realización de pruebas estadísticas comparativas, no se observó ninguna tendencia en el impacto de las características virológicas y del paciente a nivel del descenso de carga viral en tiempos cortos (D_3). Así, la reducción drástica de la carga viral fue observada de forma independiente a los valores de carga viral basal, del genotipo viral del VHC, de la presencia de cirrosis hepática, del grado de dureza hepática, de la presencia de descompensaciones hepáticas o de la exposición previa al tratamiento frente al VHC.

No obstante, en este contexto, el régimen de tratamiento elegido, resultó tener cierto impacto, o al menos una tendencia, en la dinámica viral del VHC en tiempos cortos de tratamiento. En la **figura 20** se muestra el impacto del régimen de tratamiento en la dinámica viral.

La comparación de los dos regímenes de tratamiento más comunes, SOF+DCV (27,3%, $n=3$) vs SOF+SMV (36,4% $n=4$), mostró que, a pesar de que los pacientes de ambos grupos presentaban cargas virales basales similares: 5,4 [5,2-5,8] log UI/mL en el grupo de SOF+DCV y 5,5 [5,4-5,9] log UI/mL en el grupo de SOF+SMV; el régimen basado en SOF+DCV reducía los niveles de carga viral a D_3 de forma más pronunciada (3,2 logUI/mL vs 2,6 log UI/mL, repespectivamente). Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluó el posible impacto del tratamiento basado en inhibidores

de NS5A (DCV u ombitasvir) (54,5%, n=6) frente al resto de combinaciones terapéuticas (45,5%, n=5) en el descenso de carga viral a D₃. En este sentido, se observó que, a pesar de que ambos grupos presentaban cargas virales similares previas al inicio del tratamiento: 5,8 [5,4-6,1] log UI/mL en el grupo de inhibidores de NS5A y 5,7 [5,4-6,0] log UI/mL en el resto de tratamientos; el grupo de inhibidores de NS5A conseguía una disminución más acusada de la carga viral a D₃ (3,4 logUI/mL vs 2,6 logUI/mL).

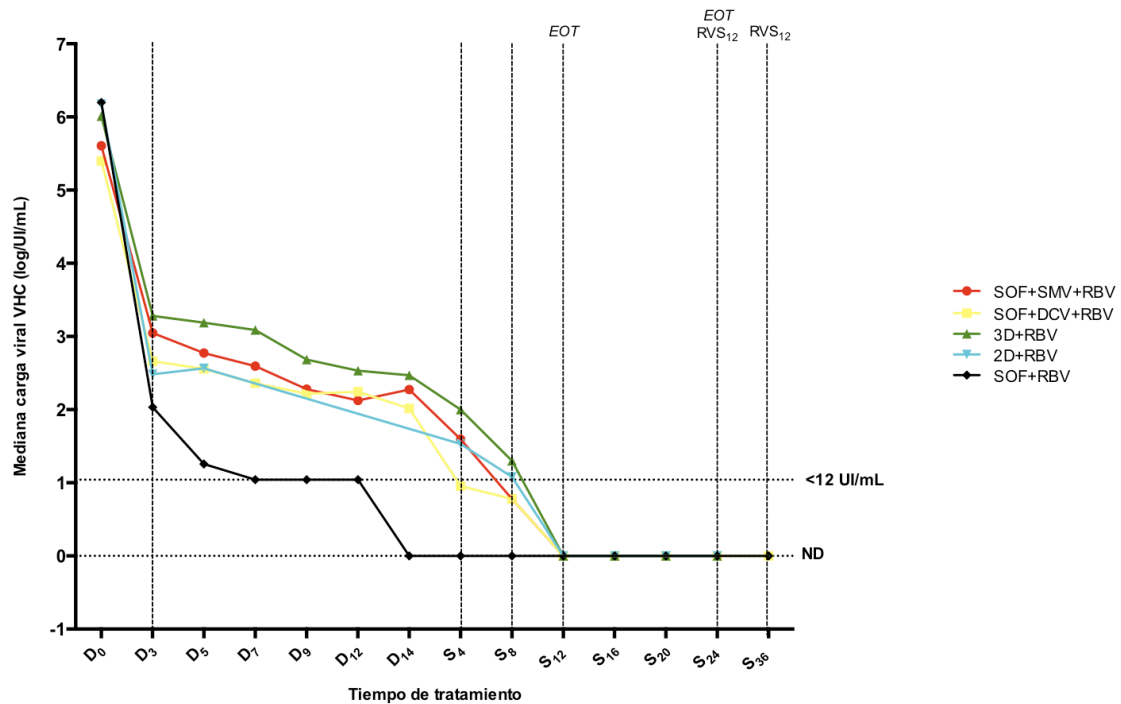


Figura 20. Dinámica viral del VHC a lo largo del periodo de tratamiento y postratamiento en función del régimen de AADs administrado. La carga viral del VHC aparece reflejada como mediana del logUI/mL. Con líneas punteadas en el eje de las abscisas se recogen los principales puntos analizados durante el estudio de la cinética viral: D₃, carga viral tras 3 días desde el inicio del tratamiento; S₄, carga viral tras 4 semanas de tratamiento; S₈, carga viral tras 8 semanas de tratamiento; EOT, carga viral al finalizar el tratamiento, RVS₁₂: carga viral tras doce semanas una vez finalizado el tratamiento. Las líneas punteadas en el eje de las ordenadas representan: <12UI/mL, carga viral detectable no cuantificable y ND, carga viral no detectables. D: día; DCV: daclatasvir; EOT: *end of treatment*; ND: carga viral no detectable; RBV: ribavirina; RVS₁₂: Respuesta viral sostenida a semana 12; S: semana SMV: simeprevir; SOF: sofosbuvir; UI/mL: unidades internacionales por mililitro VHC: Virus de la Hepatitis C; 2D: ombitasvir + paritaprevir potenciado con ritonavir; 3D: ombitasvir + paritaprevir potenciado con ritonavir + dasabuvir.

A pesar de la alta tasa de reducción de la carga viral observada en el estudio, de forma global, la proporción de pacientes con cargas ND a S₄ fue baja (27,3%, n=3),

aumentándose ligeramente dicha proporción a S₈ (45,4%, n=5). Sin embargo y, pese a lo indicado, todos los pacientes presentaban cargas virales ND al finalizar el tratamiento (EOT) y alcanzaron la RVS₁₂ con independencia de la duración del mismo (12 ó 24 semanas) (**Figura 21**).

Cuando se analizaron estos resultados en base a las características del paciente (cirrosis hepática y exposición previa a tratamiento frente al VHC) (**Figura 21**), se observó que, en los pacientes cirróticos (n=10), tan sólo el 20,0% (n=2) alcanzaba cargas virales ND a S₄ y que un 40,0% (n=4) lo hacía a S₈. Por su parte, el grupo de pacientes previamente expuestos a tratamiento frente al VHC (n=8), mostró tasas similares a las anteriormente indicadas a nivel de S₄ (25,0%, n=2), y ligeramente superiores a S₈ (88,9%, n=7). En lo que respecta a los regímenes de tratamiento en función de la duración de los mismos, el 75% (n=3) de los pacientes con tratamientos a 24 semanas (n=4), resultó estar ND a S₈ de tratamiento, mientras que tan solo el 42,8% (n=3) de los pacientes con tratamientos de 12 semanas de duración (n=7) estaban ND a S₈ de tratamiento.

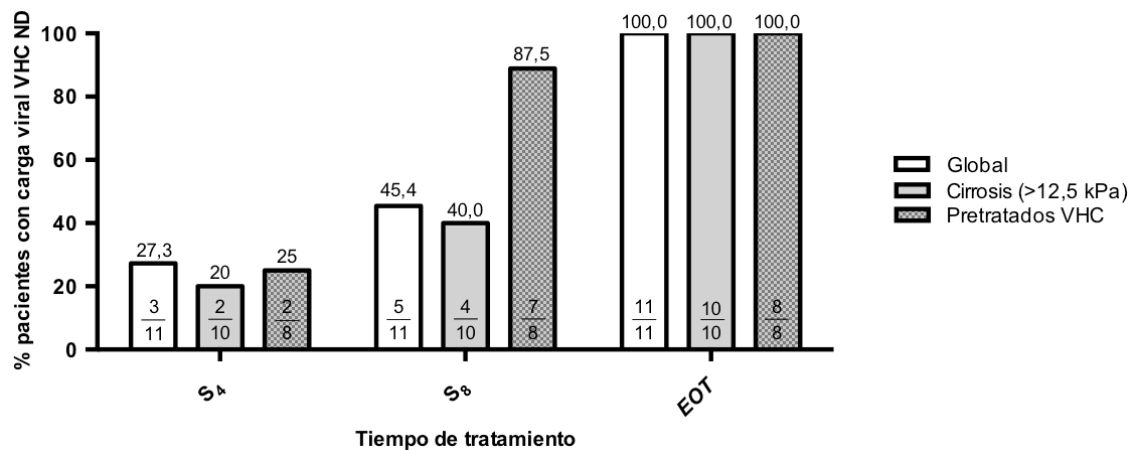


Figura 21. Proporción de pacientes con cargas virales no detectables a semanas 4, 8 y fin del tratamiento. Los datos se recogen de forma global y en función de la presencia de cirrosis hepática (>12,5 kPa) y la exposición previa a tratamiento frente al VHC. EOT: *End of treatment*; kPa: kiloPascal; ND: carga viral del VHC no detectable; S₄: semana 4 de tratamiento; S₈: semana 8 de tratamiento; VHC: Virus de la Hepatitis C.

VIII.- RESULTADOS DEL OBJETIVO 3

1.- Características de la población de estudio

Se identificaron un total de 5.984 sujetos nacidos entre 1960 y 1969 en los cuatro CS de la ciudad de A Coruña, previamente seleccionados de forma aleatoria: CS San José (20,3%, n=1215), CS Federico Tapia (23,7%, n=1419), CS Abente y Lago (18,7%, n=1117) y CS O Castrillón (37,3%, n=2233).

De forma global, el 29,8% (n=1.782) de los sujetos presentaban en su historial clínico alguna prueba serológica frente al VHC previo al periodo de reclutamiento del estudio y, de éstos, el 6,8% (n=121) presentaba acVHC+. Cuando estos resultados fueron analizados en base a los CS seleccionados, se observó que la presencia de pruebas serológicas previas frente al VHC era similar en los cuatro CS: CS San José (24,0%, n=428), CS Federico Tapia (22,3%, n=397), CS Abente y Lago (18,9%, n=338) y CS O Castrillón (34,7%, n=619). Por su parte, la distribución de la población con acVHC+ dentro del grupo de pacientes con un estado serológico del VHC conocido, fue también similar en los cuatro CS: CS San José (20,3%, n=1215), CS Federico Tapia (23,7%, n=1419), CS Abente y Lago (18,7%, n=1117) y CS O Castrillón (37,3%, n=2233). El CS con mayor porcentaje de población con un estado serológico del VHC conocido previo al estudio de cribado fue el CS O Castrillón (34,7%, n=619), mientras que el CS con un mayor número de pruebas acVHC+, previas a la realización del cribado, fue el CS Federico Tapia (9,3%, n=37).

La prevalencia de acVHC+ en la población de estudio previa a la realización del cribado fue, de forma global, del 2,0% (121/5984). Además, los 4 CS analizados presentaron prevalencias de acVHC+ similares: CS San José (2,0%, 24/1215), CS Federico Tapia (2,6%, 37/1419), CS Abente y Lago (2,4%, 338/1117) y CS O Castrillón (1,5%, 33/2233). En este contexto, la prevalencia más alta de acVHC+, se observó en el CS Federico Tapia (2,6%), mientras que el CS O Castrillón fue el CS con menor prevalencia de acVHC+ (1,5%).

En la **Tabla XIII** se recogen las características de la población seleccionada para el estudio de cribado.

Tabla XIII. Características de la población seleccionada en los cuatro centros de salud previa a la realización del programa de cribado.

| | Centro de Salud | | | | |
|---|-----------------|----------|----------------|---------------|--------------|
| | Global | San José | Federico Tapia | Abente y Lago | O Castrillón |
| Sujetos nacidos entre 1960-1969 (n) | 5.984 | 1.215 | 1.419 | 1.117 | 2.233 |
| Sujetos con serología frente al VHC (n) | 1782 | 428 | 397 | 338 | 619 |
| Sujetos con acVHC+ (n) | 121 | 24 | 37 | 27 | 33 |
| Prevalencia de acVHC+ (%) | 2,0 | 2,0 | 2,6 | 2,4 | 1,5 |

acVHC+: anticuerpos positivos frente al VHC; VHC: Virus de la Hepatitis C.

2.- Programa de cribado

Del total de los 4.202 sujetos con un estado serológico del VHC desconocido previo a la realización del estudio, el 87,3% (n=3.369) fue incluido en la aleatorización del programa de cribado. Un 8,9% (n=533) del total de sujetos no pudo ser tenido en cuenta en la aleatorización, debido a que su estado serológico del VHC no estaba correctamente identificado.

La prueba de cribado *OraQuick HCV Rapid Antibody Test* fue realizada en el 20,8% (n=765) de los sujetos aleatorizados. La distribución del porcentaje de pruebas de cribado realizadas fue similar en los cuatro CS del estudio: CS San José (34,4%, n=263), CS Federico Tapia (21,0%, n=160), CS Abente y Lago (16,7%, n=128) y CS O Castrillón (28,0%, n=214). En cuanto a la distribución por sexos de la prueba de cribado, a pesar de que la aleatorización fue simple 1:1 (hombre:mujer), el porcentaje final de pruebas realizadas en hombres fue ligeramente inferior al de mujeres (43,0%, n=329). Esta tendencia se observó en todos los CS analizados: CS San José (43,0%, n=113), CS Federico Tapia (40,6%, n=65), CS Abente y Lago (42,2%, n=54) y CS O Castrillón (45,3%, n=97).

De las 765 prueba de cribado, el *test OraQuick HCV Rapid Antibody Test* fue reactivo en el 1,4% (n=11) de los sujetos. En todos los CS se obtuvo alguna prueba de cribado positiva. Dentro de los cuatro CS, el CS San José en el que se obtuvieron más pruebas de cribado reactivas (72,7%, n=8). En relación al sexo de los sujetos, la proporción de hombres con una prueba reactiva, fue ligeramente superior a la de las mujeres (54,5%, n=6).

De las 11 pruebas de cribado reactivas, el 90,9% (n=10) pudo ser posteriormente confirmado mediante pruebas diagnósticas de laboratorio. Tan solo un sujeto con una prueba de cribado reactiva no pudo ser confirmada mediante pruebas diagnósticas de laboratorio debido a una pérdida de su seguimiento. De los sujetos con una prueba de cribado positiva y, en seguimiento durante el estudio (n=10), tan solo el 20% (n=2) de los mismos presentó una infección activa por VHC definida como acVHC+ en el ensayo *Anti-HCV II Cobas* y cargas virales del VHC cuantificables en el ensayo *AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0*.

El 80,0% (n=8) de los sujetos con una prueba de cribado positiva y en seguimiento durante el estudio, no presentó resultados positivos en las pruebas diagnósticas confirmatorias ni a nivel de acVHC ni de la carga viral. Teniendo en cuenta estos resultados, se obtuvieron 8 falsos positivos en la prueba *OraQuick HCV Rapid Antibody Test*, lo que dota a esta prueba de cribado, en el caso de nuestro estudio, de una sensibilidad del 20%. En la **Tabla XIV** se recoge la distribución de la población seleccionada en los cuatro CS para llevar a cabo el estudio de cribado y los principales resultados del mismo.

Tabla XIV. Distribución de la población seleccionada en los cuatro centros de salud para llevar a cabo el programa de cribado y resultados obtenidos tras la realización del mismo.

| | Centro de Salud | | | | |
|---|-----------------|----------|----------------|---------------|--------------|
| | Global | San José | Federico Tapia | Abente y Lago | O Castrillón |
| Sujetos sin serología frente al VHC aleatorizados en el estudio (n) | 3.669 | 778 | 1.022 | 1.117 | 1.090 |
| Prueba de cribado realizada (n) | 765 | 263 | 160 | 128 | 214 |
| Varón (%) | 43,0 | 43,0 | 40,6 | 42,2 | 45,3 |
| Prueba de cribado reactiva (n) | 11 | 8 | 1 | 1 | 1 |
| Confirmación por prueba diagnósticas (n) | 10* | 7* | 1 | 1 | 1 |
| acVHC+ (n) | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Carga viral VHC positiva (n) | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |

*El resultado reactivo de la prueba de cribado no pudo ser confirmado mediante pruebas diagnósticas de laboratorio debido a una pérdida de seguimiento del sujeto. acVHC+: anticuerpos positivos frente al VHC; VHC: Virus de la Hepatitis C.

3.- Características de los sujetos con infección crónica confirmada tras el programa de cribado

Las principales características epidemiológicas, clínicas y virológicas de los dos pacientes con infección crónica confirmada derivados del programa de cribado aparecen recogidos en la **Tabla XV**.

Tabla XV. Principales características epidemiológicas, clínicas y virológicas de los dos pacientes con infección crónica por VHC derivados del programa de cribado.

| | Paciente 1 | Paciente 2 |
|---|---------------|--|
| Centro de Salud del que derivan | Abente y Lago | O Castrillón |
| Género | Varón | Mujer |
| Edad (años) | 52 | 48 |
| Vía de transmisión del VHC | ADVP | Transfusión sanguínea previa a 1990 |
| Genotipo VHC | 1a | 1b |
| CV VHC (logUI/mL) | 6,3 | 5,1 |
| Dureza hepática (<i>FibroScan</i> , kPa) | 12,3 | 5,6 |
| Tratamiento activo frente al VHC | Si (SOF+LDV) | No |

ADVP: Adictos a drogas por vía parenteral; CV VHC: carga viral del VHC; kPa: kiloPascal; LDV: ledipasvir; SOF: sofosbuvir; UI/mL: Unidades internacionales por mililitro; VHC: Virus de la Hepatitis C.

El paciente 1, procedente del CS Abente y Lago, fue un varón de 52 años, infectado con un subtipo viral 1a y una carga viral del VHC de 6,3 logUI/mL. Por su parte, el paciente 2, procedente del CS O Castrillón, fue una mujer de 48 años, infectada con un subtipo viral 1b y una carga viral del VHC de 5,1 logUI/mL. Un aspecto importante a destacar dentro de las características de ambos pacientes fue la presencia de factores de riesgo del VHC: ADVP en el caso del paciente 1 y transfusión sanguínea previa al cribado de los productos sanguíneos y hemoderivados de 1990 en el paciente 2.

En relación al grado de fibrosis hepática en el momento del diagnóstico, ésta fue evaluada en ambos pacientes mediante ET. La dureza hepática del paciente 1 fue de 12,3 kPa mientras que el paciente 2, fue de 5,6 kPa. En base a estos resultados y siguiendo las recomendaciones del PEAHC de mayo de 2015⁴², el paciente 1 inició, debido a su fibrosis avanzada (F3) en el momento del diagnóstico, tratamiento frente al VHC. El régimen de tratamiento seleccionado fue SOF junto con el inhibidor de NS5A ledipasvir (LDV). Por su parte, el paciente 2, con una fibrosis leve (F1), no inició tratamiento frente al VHC, sino que continuó en seguimiento clínico en las consultas del Servicio de Medicina Interna B de la XXIAC.

4.- Estimación de la infección por VHC en personas nacidas entre 1960-1969 en el área sanitaria de A Coruña y Galicia

En base a los datos obtenidos en este estudio se determinó que la prevalencia a nivel global de acVHC+ en personas nacidas entre 1960 y 1969, definida ésta como sujetos con una serología acVHC+ o una infección por VHC confirmada tras una prueba de cribado reactiva, fue del 2,05% (95% IC:1,69-2,41). Por su parte, la prevalencia de acVHC+ oculta en personas con un estado serológico desconocido nacidas entre 1960

y 1969 fue del 0,26% (95% IC: 0,03-0,94). Esta prevalencia se definió como la proporción de sujetos con una serología acVHC+ confirmada tras una prueba reactiva de cribado y el número total de sujetos en los que la prueba de cribado fue realizada.

En la **Tabla XVI** se recoge, en base a los datos demográficos disponibles en el *IGE*, la estimación del número de personas, nacidas entre 1960 y 1969, no diagnosticadas por VHC en la ciudad de A Coruña, en su área sanitaria y en Galicia. Además, se recoge también en esta misma población una estimación del número global de personas con acVHC+.

Tabla XVI. Estimación de la infección por VHC no diagnosticada y de la seroprevalencia del VHC en personas nacidas entre 1960 y 1969 en la ciudad de A Coruña, su área sanitaria y la comunidad autónoma gallega.

| | Infección por VHC no diagnosticada | | | Seroprevalencia de la infección por VHC | | |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| | Media | Limite inferior | Limite superior | Media | Limite inferior | Limite superior |
| Prevalencia (%) | 0,26 | 0,03 | 0,94 | 2,05 | 1,69 | 2,41 |
| Ciudad de A Coruña (n) | 93 | 11 | 336 | 731 | 603 | 859 |
| Área Sanitaria de A Coruña (n) | 219 | 27 | 787 | 1.711 | 1.410 | 2.012 |
| Galicia (n) | 1.068 | 131 | 3.845 | 8.360 | 6.892 | 9.829 |

VHC: Virus de la Hepatitis C.

En base a los resultados obtenidos, se estima que en el área sanitaria de A Coruña, un total de 219 personas nacidas entre 1960 y 1969 están infectadas por VHC y lo desconocen. Esta cifra asciende a 1.068 personas cuando se tiene en cuenta toda la población de la comunidad autónoma gallega. En lo que respecta a la infección global por VHC en personas nacidas entre 1960 y 1969, se estima que en la ciudad de A Coruña 731 personas tienen acVHC+, cifra que asciende hasta las 8.360 personas en Galicia.

IX.- DISCUSIÓN

La infección por VHC es un problema grave de salud pública a escala mundial que afecta a más de 71 millones de personas en todo el mundo^{31,45}. La infección por VHC se caracteriza por la acumulación progresiva de fibrosis hepática que, en estadios finales de la enfermedad, lo que conduce al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular¹⁹. La introducción de los AADs ha marcado un hito en la historia del tratamiento frente al VHC, al permitir alcanzar tasas de RVS superiores al 90%, haciendo cada vez más plausible la erradicación de la infección²¹⁰. No obstante, en este nuevo escenario terapéutico sigue siendo necesaria una optimización tanto de los tratamientos como de su monitorización, así como la búsqueda de marcadores que permitan identificar poblaciones con mayor riesgo de progresión de la enfermedad. Además, cabe destacar que, pese a la alta eficacia de los AADs, se estima que un 80% de la infección por VHC a nivel mundial continua sin ser diagnosticada⁴⁵, por lo que se requiere de la implementación y optimización de programas de cribado activos que permitan identificar aquellas personas infectadas por el VHC.

En este contexto, en el primero de los estudios propuesto en esta tesis doctoral se evaluó el impacto de los principales haplogrupos europeos de ADNmt en la evolución clínica de la infección crónica por VHC en una cohorte de 146 pacientes VHC monoinfectados y 206 pacientes co-infectados VIH-VHC en seguimiento clínico en dos hospitales de Galicia (*XXIAC/XXIF*). En este contexto y, a nuestro conocimiento, este es el primer estudio realizado hasta el momento que en el que se evalúan el impacto de los haplogrupos europeos de ADNmt en pacientes monoinfectados VHC. En cuanto a la distribución de los haplogrupos, el más prevalente dentro de la población de estudio fue el H (50,3%, n=177). Los haplogrupos de ADNmt se asociaron con los niveles de fibrosis hepática y, en este sentido, el cluster de haplogrupos minoritarios *Others* (I,W,X) y el haplogrupo V, se reconocieron como un factor de riesgo para el desarrollo de fibrosis hepática. Por su parte, el genotipo 4, fue identificado con una menor progresión de la fibrosis hepática.

En cuanto a la distribución de la prevalencia observada de los haplogrupos europeos de ADN mitocondrial en nuestro estudio, ésta fue similar a la previamente descrita en población general europea. En dicha población, se ha descrito el haplogrupo H como más prevalente (40,0-50,0%), seguido del U (20-30%) y de los haplogrupos T y J (8,0-10,0% respectivamente). Por su parte, el resto de los haplogrupos (V, K, W, X e I) son minoritarios y sus frecuencias individuales no suelen exceder al 5%²¹¹. Además de esta similitud encontrada con la población europea general, la distribución de los haplogrupos observada en este estudio fue también similar a la encontrada por otros autores en estudios realizados en población europea co-infectada VIH-VHC^{166,172}.

En relación al impacto de los haplogrupos de ADNmt en la progresión e incidencia de ciertas patologías, varios estudios han observado una asociación de los mismos tanto en enfermedades relacionadas con etiologías metabólicas e inflamatorias como la artrosis^{161,162}, como en enfermedades infecciosas^{164,212} como la infección por VIH-SIDA.

Por su parte y, a pesar de la existencia de una relación clara entre la mitocondria y ciertas enfermedades hepáticas como la infección crónica por VHC²¹³ o la esteatohepatitis no alcohólica (*non alcoholic steatohepatitis*, NASH), el impacto de los haplogrupos de ADNmt en la patología hepática ha sido poco estudiado hasta el momento^{172,214}. Desde nuestro conocimiento, tan sólo dos estudios han evaluado el impacto de los haplogrupos de ADNmt en patologías hepáticas: uno de ellos en la infección por VHC²¹³ y otro en la progresión e incidencia de NASH²¹⁴.

En este contexto, la identificación del haplogrupo europeo mitocondrial H como un factor protector en el desarrollo de fibrosis hepática ha sido descrita previamente. Así, y en consonancia con nuestro resultados, García-Álvarez y colaboradores, en una cohorte de 231 pacientes co-infectados VIH-VH identificaron al haplogrupo H y al cluster de haplogrupos HV (equivalente a nuestro cluster H+SHV) con menores niveles de fibrosis y cirrosis hepática. Este efecto protector del haplogrupo H y/o del cluster SHV, se ha observado también en otras patologías como la infección por VIH, en la que, portar dicho haplogrupo²¹³, parece conferir un menor riesgo de progresión hacia estadios finales de SIDA, así como una mejor recuperación inmune tras el inicio de TAR^{165,166} también ha sido observado en otros.

Por su parte, los haplogrupos identificados en nuestro estudio con mayores tasas de fibrosis hepática en pacientes con infección crónica por VHC, haplogrupo V y el *cluster* de haplogrupos minoritarios *Others* (IX,W), fueron diferentes a los previamente descritos en la literatura. En este contexto, el estudio llevado a cabo por García-Álvarez y colaboradores identificó al haplogrupo U con mayores niveles de fibrosis y con una mayor probabilidad de cirrosis hepática²¹³. Una posible explicación acerca éstas diferencias observadas puede ser la heterogenicidad de las poblaciones analizadas y/o la propia metodología y diseño de ambos estudios. Así, en nuestro estudio se incluyeron pacientes monoinfectados VHC y co-infectados VIH-VHC, mientras que en el llevado a cabo por García-Álvarez y colaboradores, todos los sujetos reclutados eran pacientes co-infectados VIH-VHC. Además, la prevalencia observada entre los haplogrupos con mayor fibrosis, U y *Others*, fue diferente en función del estudio analizado: el haplogrupo U representó, en nuestra población, un 12,5% de los pacientes, mientras que este mismo haplogrupo, en el de García-Álvarez

y colaboradores ascendió hasta 25,1%. Estas mismas diferencias fueron observadas en el cluster *Others*, ligeramente superior en nuestro estudio que en el de García-Álvarez y colaboradores (9,7% vs 4,3%). Otras posible diferencia a tener en cuenta a la hora de evaluar los resultados obtenidos fue la forma de monitorizar la fibrosis hepática, ET en nuestro estudio y biopsia hepática en el de García-Álvarez y colaboradores.

Además de lo indicado, un estudio reciente ha identificado al cluster de haplogrupos minoritarios *Others*, (I,X,W) como un factor de peor pronóstico en el desarrollo de *NASH*²¹⁴. Así, Mehta y colaboradores identificaron una mayor proporción de pacientes portadores del haplogrupo *Others*, definidos en su estudio como haplogrupos minoritarios A, C, I, W, M, N, X, B y R, dentro del grupo de pacientes con *NASH* en comparación con el grupo de pacientes control, así como una mayor proporción de fibrosis pericelular en dicho grupo. Estos resultados refuerzan las observaciones descritas en nuestro estudio acerca del impacto de haplogrupos de ADNmt en la enfermedad hepática con independencia a etiología de la misma.

Una posible explicación acerca del papel de los haplogrupos de ADNmt en la enfermedad hepática, puede deberse a la diferente fisiología y metabolismo celular derivada de los mismos y que parece actuar predisponiendo a las célula a un ambiente más favorable para el desarrollo de la fibrosis hepática. En este sentido, se han observado diferencias entre los haplogrupos de ADNmt a nivel de: (i) la eficiencia del proceso de forforilación oxidativa, que determina la producción de ROS y ATP²¹⁵; (ii) los niveles y/o susceptibilidad al estrés oxidativo, apoptosis y respuesta inflamatoria²¹⁶ y (iii) la capacidad de éstos en la modulación de la expresión de genes nucleares de respuesta antiinflamatoria y de defensa antioxidante inducidos por estrés oxidativo²¹⁷. Así, en este contexto, el haplogrupo mitocondrial H, debido a su menor tasa de mutación en su genoma mitocondrial, ha sido propuesto como uno de los haplogrupos más eficientes a nivel de estrés oxidativo, maximizando la producción de ATP a costa de una mayor producción de ROS²¹⁸. A pesar de lo indicado anteriormente, los mecanismos moleculares que subyacen a las diferencias funcionales de los haplogrupos no han sido del todo estudiadas, lo que dificulta la búsqueda de una explicación molecular a los resultados obtenidos.

Teniendo en cuenta el diferente perfil del metabolismo oxidativo descrito en los haplogrupos y el papel inductor de las ROS en la activación de las CEH y la subsecuente fibrogénesis derivada de la misma^{67,219} cabría esperar que el haplogrupo H mostrase niveles mayores de fibrosis hepática^{213,219}. Sin embargo, esta base

metabólica también podría explicar el efecto protector observado ya que los niveles incrementados de *ATP* y *ROS*, actuarían como activadores de la defensa antioxidante y de la inmunidad innata del huésped^{219,220}. Una posible explicación que combine el efecto de *ROS* sobre la respuesta inmune innata y las defensas antioxidantes, se basaría en que las tasas elevadas de *ROS* pueden, primero, producir un incremento de las defensas antioxidantes hasta niveles en las que *ROS* no cause ningún tipo de daño hepático²²¹ y, segundo, inducir una activación de la respuesta inmune innata que retrase el proceso de fibrosis al asegurar un buen control de la replicación viral²²², que a su vez puede disminuir la producción de *ROS* y de la apoptosis celular^{223,224}. En este sentido, sería necesario profundizar en este mecanismo descrito con el fin de comprobar si es verdaderamente el responsable de la progresión más lenta de la enfermedad observada en aquellos individuos portadores del haplogrupo mitocondrial H.

En cuanto al análisis multivariante realizado para evaluar el posible impacto de otras variables, además de los haplogrupos de ADNmt, en la cirrosis hepática se identificó al genotipo 4 como un factor de protección ante el desarrollo de cirrosis, en comparación con el genotipo 1. El genotipo 4 es característico de las regiones de Oriente Medio y África, donde es responsable del 80% de las infecciones por VHC, pero sobretudo de la región de Egipto, en la que se concentra aproximadamente el 75% de las infecciones por genotipo 4 a nivel mundial^{44,59}. La relación del genotipo 4 con la progresión de la fibrosis hepática y la presencia de cirrosis no ha sido del todo clarificada y, en ocasiones, puede llegar a ser contradictoria en función del estudio consultado²²⁵. Así, ciertos estudios longitudinales de progresión de fibrosis hepática indican que las tasa de progresión no son significativamente diferentes a las encontradas en otros genotipos (1,2 y 3)²²⁶. Otros estudios transversales muestran valores más altos de fibrosis hepática en pacientes portadores del genotipo 4 en comparación con el resto de los genotipos virales (particularmente uno de los estudios indica que el genotipo 4 presenta mayores valores de *FibroScan* en comparación con el genotipo 1)^{227,228}. La discrepancia entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios puede ser explicada por las diferentes características de las cohortes estudiadas. Esto es así, ya que los valores elevados de fibrosis hepática asociados al genotipo 4 fueron obtenidos en cohortes de pacientes co-infectados por VIH y con infección por *Schistosoma mansoni*, dos factores ya definidos como elementos de riesgo en la progresión de la fibrosis hepática²²⁵. En este sentido, no hay suficientes datos publicados hasta el momento que permitan indicar el impacto del genotipo 4 en la progresión de la fibrosis hepática.

A pesar de que el genotipo 3 ha sido identificado en varios estudios como un factor un factor de riesgo en el desarrollo de cirrosis hepática y de CHC en comparación con el resto de genotipos^{98,99}, en el presente estudio no se relacionó la presencia de dicho genotipo con mayores tasa de cirrosis.

La edad avanzada del paciente fue identificada como un factor de riesgo asociado a la presencia de cirrosis. Este resultado coincide con otros estudios ya publicados^{88,226}. Por el contrario, el género no fue identificado como una variable relacionada con la cirrosis hepática, a pesar de que ciertos estudios han identificado al género masculino como un factor de riesgo para el desarrollo de la misma, al poseer una tasa de progresión de fibrosis 10 veces superior a la de las mujeres²²⁶. Esta discrepancia en los resultados puede ser debida a un efecto cohorte. Así, el bajo porcentaje de mujeres presente en la población objeto de estudio podría hacer que éstas tengan un bajo peso en el análisis estadístico realizado.

El estudio de marcadores genéticos del huésped implicados en la evolución de la enfermedad hepática se ha presentado como una herramienta prometedora para el manejo de la infección por VHC^{131,132,134}. Así, durante los primeros años desde el lanzamiento de los primeros AADs, cuando su acceso estaba restringido a pacientes F2-F4^{42,83}, la utilización de estos marcadores tenía su utilidad en la identificación de poblaciones con mayor riesgo de progresión de la fibrosis, en las que sería conveniente una priorización del tratamiento independientemente a su nivel de fibrosis previo al tratamiento. En este sentido y, en base a los resultados obtenidos, sería prioritario el inicio de tratamiento en aquellos pacientes con genotipo 1 y el haplogrupo de ADNmt *Others* (I,W,X) o V. No obstante, la reciente eliminación de las restricciones en el acceso al tratamiento^{81,82,84}, ha cambiado el enfoque sobre la utilidad del uso de marcadores genéticos, centrándose ya no en la priorización, sino en una medicina personalizada que permita identificar poblaciones de riesgo, en las que el seguimiento y manejo de la infección ha de realizarse de forma más estricta y continuada. Además de lo indicado y, derivado de la mejora del conocimiento acerca de la fisiopatología del proceso de fibrosis, así como del aumento de la evidencia sobre su reversibilidad una vez alcanzada la RVS¹³⁰, ha supuesto un nuevo escenario para la búsqueda de factores genéticos implicados en dicho proceso.

Este estudio presenta ciertas limitaciones que deben ser tenidas en cuenta a la hora de una correcta interpretación de los resultados obtenidos. Una de las principales limitaciones es el tamaño muestral empleado para la elaboración del mismo, el cual es relativamente bajo para un estudio de asociación genético-epidemiológico¹⁵². Este

tamaño muestral, sumado a la baja prevalencia de ciertos haplogrupos mitocondriales hace que la potencia del análisis estadístico disminuya y que la obtención de significación estadística, a pesar de verse tendencias claras, no sea posible en la mayor parte de los casos. De este modo, se requiere de un aumento del tamaño muestral con el fin de clarificar ciertas asociaciones, así como para valorar el mantenimiento de las ya encontradas. Además de lo indicado y, pese a ser tenidas en cuenta en los análisis planteados, ciertos factores de riesgo en la fibrosis hepática previamente descritos en la literatura (consumo de alcohol, tabaco, obesidad o la presencia de síndrome metabólico) no pudieron ser analizados de forma robusta debido a la ausencia de una gran cantidad de datos o por dificultades para su codificación sistemática y cuando lo fueron, el escaso número de pacientes no permitió tener resultados concluyentes. Otro aspecto a tener en cuenta en este tipo de estudio, a la hora de evaluar los resultados, es el posible efecto cohorte derivado de las características de nuestra población. En este punto, la extrapolación de los resultados aquí mostrados al resto de poblaciones requeriría una validación de los mismos en otras cohortes de pacientes con características epidemiológicas diferentes. Para finalizar, resultaría no solo interesante poder evaluar de forma prospectiva estos resultados, analizando, de una forma longitudinal el progreso de la fibrosis, sino también hacerlo mediante la combinación de diversas técnicas no invasivas, con el fin de aumentar así la información disponible acerca del estado de la fibrosis hepática .

El objetivo del segundo estudio de la presente tesis doctoral fue la caracterización de la dinámica viral del VHC en las primeras fases del tratamiento y sus implicaciones en la monitorización y duración del mismo, en 11 pacientes con infección crónica por VHC que iniciaron regimenes basados en AADs en la XX/AC. La cohorte seleccionada para llevar a cabo este estudio, se caracterizó por una alta prevalencia de cirrosis hepática y de pacientes previamente expuestos a tratamientos frente al VHC (90,2% y 72,7%, respectivamente). De forma general, se observó un rápido descenso de la carga viral del VHC a D₃ de tratamiento [3,2 [2,3-3,7] log UI/mL], lo que supone una reducción relativa de la carga viral basal de más del 99,0%. Por otro lado y, a pesar del rápido descenso de la carga viral en las primeras fases del tratamiento, una baja proporción de pacientes presentaba cargas virales ND en las semanas 4 y 8 (27,8% y 45,4%, respectivamente). Todos los pacientes del estudio alcanzaron carga viral ND al finalizar el tratamiento, así como la RVS₁₂. Teniendo en cuenta las características de los pacientes seleccionados, este estudio, se presenta como una prueba de concepto acerca del impacto de la dinámica viral en poblaciones difíciles de tratar en vida real, en las que ésta aún no ha sido evaluada en profundidad.

La caída bifásica de la carga viral durante el tratamiento del VHC observada en nuestra cohorte, ha sido descrita por estudios clásicos como el de Neuman y colaboradores y responde a dos procesos diferentes en la erradicación del virus²²⁹. Así, la primera fase, caracterizada por un descenso rápido de la carga viral, se produce debido al bloqueo activo de la producción de nuevas partículas virales por parte del fármaco y por el aclaramiento de los viriones presentes en el plasma. Por otro lado, la segunda fase, caracteriza por un descenso más lento de la carga viral, se produce por la muerte progresiva de las células previamente infectadas así como por el bloqueo continuado de la replicación viral, que impide la infección de nuevos hepatocitos^{122,230}. En este contexto, estudios recientes llevados a cabo en el campo de la dinámica viral, han demostrado un descenso bifásico más marcado en tratamientos con AADs en comparación los basados en IFN². Así, se ha descrito una eliminación más rápida y pronunciada de las partículas virales durante la primera y segunda fase en los AADs, derivada no sólo de la capacidad inhibitoria selectiva de estos fármacos, sino también de su capacidad para eliminar el ARN viral y “curar” así las células infectadas².

Además de lo indicado, el perfil de cinética viral dentro de los AADs parece variar en función de las familias de fármacos analizados. En este sentido, Guedj y colaboradores observaron que los inhibidores de NS5A presentan una mayor potencia antiviral que otras familias de AADs en las primeras fases del tratamiento²³¹. Estos resultados coinciden con los observados en el presente estudio, a pesar del pequeño tamaño muestral. Así, todos los pacientes que presentaban un régimen basado en el uso de inhibidores de NS5A (DCV u ombitasvir) una disminución más acusada de la carga viral a D₃ (3,4 logUI/mL vs 2,6 logUI/mL) que el resto de combinaciones terapéuticas. Una posible explicación a este resultado, puede deberse al doble mecanismo de acción de los inhibidores de NS5A, los cuales bloquean tanto la replicación viral como la exportación de las partículas virales²³¹.

En lo que respecta a la dinámica viral en pacientes cirróticos y/o previamente expuestos a tratamiento frente al VHC, ésta ha sido evaluada en pocos estudios y en reducido número de pacientes^{123,232,233}. En estos estudios se observó una disminución más lenta de los niveles de carga viral durante la segunda fase de la dinámica de caída del virus en comparación con pacientes *naïve* o no cirróticos. En nuestro caso no fue posible confirmar este comportamiento debido a la heterogeneidad de la población estudiada (genotipo del VHC y pauta de tratamiento). Sin embargo, cuando se compararon dos pacientes previamente expuestos a tratamiento frente al VHC, con el mismo genotipo y pauta de tratamiento (pacientes 8 y 9), se observó que el paciente

no cirrótico (paciente 8) mostraba una mayor disminución de los niveles de ARN viral en ambas fases de la cinética viral en comparación con el paciente cirrótico.

La utilidad de la dinámica viral en la monitorización del tratamiento ha evolucionado de forma paralela al desarrollo de nuevos fármacos y combinaciones. Así, durante los tratamientos basados en el uso de IFN, la evaluación de la dinámica viral fue utilizada como una herramienta para la personalización de la duración de las terapias, proporcionando así la base para el establecimiento de reglas de parada del tratamiento, que permitían no sólo optimizar el balance coste-eficacia sino también reducir los efectos adversos^{118,119}. Sin embargo, en el actual contexto terapéutico, la utilidad de la cuantificación de la carga viral del VHC durante el tratamiento, así como la utilización de reglas de parada se ha puesto en entredicho y su recomendación ha sido eliminada de las principales guías terapéuticas^{81,82}.

A pesar de lo indicado previamente, ciertos estudios han re-evaluado la posible utilidad de la cuantificación de la carga viral en la respuesta predictiva a los tratamientos basados en AADs, buscando nuevas reglas de parada que permitan optimizar y personalizar las actuales terapias^{111,117,121-124}. En este contexto, el estudio llevado a cabo por Sidharthan y colaboradores para evaluar el posible efecto predictivo de la carga viral en diferentes puntos del tratamiento sobre la RVS₁₂, no observó ningún tipo de capacidad predictiva acerca de evaluar la carga viral a semana 4¹²³. Estos resultados son similares a los encontrados en nuestra cohorte, en la que a pesar de que tan solo un 27,8% de los pacientes poseían cargas virales ND a semana 4, todos ellos alcanzaron la RVS₁₂. En este sentido, los estudios de asociación de la carga viral y la RVS en las terapias basadas en AADs son todavía escasos y, en la mayoría de ellos, la dinámica viral se evaluó de una forma incompleta y en poblaciones de pacientes con características muy concretas (pacientes genotipo 1, no cirróticos y *naïve* a tratamiento)¹²⁵. Es por ello que se requiere de la realización de nuevos estudios que permitan evaluar si verdaderamente la cinética viral podría ayudar a optimizar las actuales terapias.

En lo que respecta a la duración del tratamiento, existen estudios que han demostrado la posibilidad de erradicar la infección por VHC en 3-6 semanas¹¹³⁻¹¹⁷. Sin embargo y, a pesar de estos prometedores resultados, muchos de los estudios han sido llevado a cabo en poblaciones de pacientes reducidas, altamente seleccionadas y con características favorables a la respuesta (genotipo 1, no cirróticos y *naïve* a tratamiento). Estas características, sumadas a las múltiples y complejas combinaciones terapéuticas analizadas en los mismos, hacen que la evaluación de la

duración del tratamiento sea caótica e impiden la obtención de conclusiones claras que puedan ser utilizadas de forma general en la práctica clínica diaria. Es por ello que las actuales guías terapéuticas no recomiendan pautas con una duración inferior a 8 semanas^{81,82}. Así, son necesarios futuros estudios en cohortes de pacientes más extensas para esclarecer este aspecto de la terapia.

A pesar de la utilidad de este estudio como una prueba de concepto acerca del impacto de la dinámica viral en el manejo terapéutico de poblaciones de pacientes difíciles de tratar, existen ciertas limitaciones que deben ser tenidas en cuenta para la correcta interpretación de los resultados. Así, el número de pacientes es limitado y presenta características heterogéneas, lo que hace difícil llevar a cabo la comparación entre subpoblaciones. En este sentido, sería interesante aumentar el tamaño muestral en futuros estudios con el fin de poder extraer conclusiones más precisas acerca de la utilidad de la dinámica viral en la optimización de la duración y monitorización de las actuales pautas de tratamiento.

X.- CONCLUSIONES

- El haplogrupo europeo de ADN mitocondrial (ADNmt) H es el haplogrupo más prevalente (50,3%) entre los pacientes con infección crónica por el Virus de la Hepatitis C (VHC) tanto monoinfectados como co-infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) en el área sanitaria de A Coruña.
- Los haplogrupos europeos de ADNmt se asocian con los niveles de fibrosis hepática de los pacientes con infección crónica por VHC del área sanitaria de A Coruña siendo el haplogrupo V y el *cluster* de haplogrupos minoritarios *Others* (I,X,W), los que se relacionaron con un mayor grado de fibrosis hepática (16,1 y 11,3 kPa, respectivamente).
- Una mayor proporción de pacientes pertenecientes al *cluster* de haplogrupos *Others* + V presentaron cirrosis hepática (>12,5 kPa), en comparación con aquellos pertenecientes al *cluster* H+SHV (47,4% vs 25,3%, p-valor = 0,009).
- El análisis multivariante identificó al *cluster* de haplogrupos *Others* + V como un factor de riesgo para el desarrollo de cirrosis hepática en comparación con el *cluster* H+SHV [OR = 2,429; p-valor = 0,031]. Por otro lado, el genotipo 1 del VHC, se asoció con una mayor probabilidad de desarrollo de cirrosis hepática en comparación con el genotipo 4 (OR = 0,363; p-valor = 0,026). La edad avanzada, también se identificó como un factor de riesgo para el desarrollo de cirrosis hepática (OR = 1,076, p-valor = 0,000).
- La dinámica de la carga viral (CV) del VHC en los regímenes basados en el uso de AADs en poblaciones de pacientes con estadios avanzados de fibrosis hepática describe una caída bifásica. La mediana de descenso de la CV del VHC, a día 3 de tratamiento es de 3,2 [2,3-3,7] log UI/mL, lo que supone una reducción relativa del 99% de la CV en el 90% de los pacientes.
- Los regimenes basados en el uso de inhibidores de NS5A, presentan los descensos más acusados de la CV del VHC a día 3 que el resto de combinaciones (3,4 vs 2,6 log UI/mL, respectivamente).
- A pesar del rápido descenso de la CV en los primeros días de tratamiento con AADs, una baja proporción de pacientes alcanzó la indetectabilidad a semana 4 y 8 tras el inicio de la terapia (27,3% y 45,4%, respectivamente). Sin

embargo, todos los pacientes alcanzaron respuesta viral sostenida a las 12 semanas de finalizar el mismo.

- La seroprevalencia global de la infección por VHC en personas nacidas entre 1960 y 1969 en cuatro centros de atención primaria (CAPs) de la ciudad de A Coruña, fue del 2,05% (95% IC: 1,69-2,41).
- Hasta un 29,8% de los sujetos nacidos entre 1960 y 1969 y pertenecientes a los cuatro CAPs analizados, desconocían su estado serológico en relación a la infección por VHC. Entre ellos, la prevalencia de infección por VHC en sujetos nacidos entre 1960 y 1969 y que desconocían su estado serológico fue del 0,26% (95% IC: 0,03-0,94).
- Con las cifras obtenidas se estimó que entre las personas nacidas entre 1960 y 1969 en el área Sanitaria de A Coruña y en Galicia, 219 y 1.068 personas, respectivamente, podrían presentar una infección activa por VHC no diagnosticada.

XI.- BIBLIOGRAFÍA

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. Apr 21 1989;244(4902):359-362.
2. Simmonds P, Becher P, Bukh J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *The Journal of general virology*. Jan 2017;98(1):2-3.
3. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jun 4 2013;110(23):9505-9510.
4. Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of virology*. Jul 2002;76(14):6919-6928.
5. Moradpour D, Penin F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;369:113-142.
6. Niepmann M, Shalamova LA, Gerresheim GK, Rossbach O. Signals Involved in Regulation of Hepatitis C Virus RNA Genome Translation and Replication. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:395.
7. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews. Microbiology*. Jun 2007;5(6):453-463.
8. Madan V, Bartenschlager R. Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin. *Viruses*. Aug 6 2015;7(8):4461-4481.
9. Gouttenoire J, Penin F, Moradpour D. Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Reviews in medical virology*. Mar 2010;20(2):117-129.
10. Ross-Thriepland D, Harris M. Hepatitis C virus NS5A: enigmatic but still promiscuous 10 years on! *The Journal of general virology*. Apr 2015;96(Pt 4):727-738.
11. Fernandez-Ponce C, Dominguez-Villar M, Munoz-Miranda JP, et al. Immune modulation by the hepatitis C virus core protein. *Journal of viral hepatitis*. May 2017;24(5):350-356.
12. Diamond DL, Syder AJ, Jacobs JM, et al. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS pathogens*. Jan 2010;6(1):e1000719.
13. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. Jul 22 2005;309(5734):623-626.
14. Povedin P, Carpentier A, Pene V, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology*. Oct 2010;139(4):1355-1364.
15. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *Journal of hepatology*. Nov 2014;61(1 Suppl):S3-S13.
16. Reynolds GM, Harris HJ, Jennings A, et al. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology*. Feb 2008;47(2):418-427.
17. Lindenbach BD. Virion assembly and release. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;369:199-218.
18. Huang H, Sun F, Owen DM, et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Apr 3 2007;104(14):5848-5853.
19. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *Journal of hepatology*. Nov 2014;61(1 Suppl):S58-68.
20. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet*. Jul 26 2008;372(9635):321-332.
21. Kamal SM. Acute hepatitis C: a systematic review. *The American journal of gastroenterology*. May 2008;103(5):1283-1297; quiz 1298.
22. Micaleff JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *Journal of viral hepatitis*. Jan 2006;13(1):34-41.
23. Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, et al. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology*. Jan 2014;59(1):109-120.
24. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *The New England journal of medicine*. Aug 19 1999;341(8):556-562.

25. Danta M, Semmo N, Fabris P, et al. Impact of HIV on host-virus interactions during early hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases*. Jun 1 2008;197(11):1558-1566.
26. Duggal P, Thio CL, Wojcik GL, et al. Genome-wide association study of spontaneous resolution of hepatitis C virus infection: data from multiple cohorts. *Annals of internal medicine*. Feb 19 2013;158(4):235-245.
27. Rosen HR. Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection. *The Journal of clinical investigation*. Oct 2013;123(10):4121-4130.
28. Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahm MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology*. Aug 2008;48(2):418-431.
29. Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savey L, Desbois AC, Saadoun D. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Therapeutic advances in infectious disease*. Feb 2016;3(1):3-14.
30. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. May 2012;142(6):1264-1273 e1261.
31. World Health Organization. Resolution WHA67.6. Hepatitis. In: Sixty-seventh World Health Assembly. Geneva: World Health Organization. 2014; http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA67/A67_R6-en.pdf. Accessed 19 February 2019.
32. World Health Organization. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. 2018; <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273174/9789241550345-eng.pdf>. Accessed 19 February 2019.
33. Control ECfDPa. Hepatitis C. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. 2018; https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-hepatitis-C.PDF. Accessed 19 February 2019.
34. Control. ECfDPa. Systematic review on hepatitis B and C prevalence in the EU/EEA. 2016; <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/systematic-review-hepatitis-B-C-prevalence.pdf>. Accessed 19 February 2019.
35. Bruguera M, Forns X. [Hepatitis C in Spain]. *Medicina clinica*. Jun 17 2006;127(3):113-117.
36. Calleja-Panero JL, Llop-Herrera E, Ruiz-Moraga M, et al. Prevalence of viral hepatitis (B and C) serological markers in healthy working population. *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*. May-Jun 2013;105(5):249-254.
37. Chimeno MM, Chocarro A, Brezmes P, Ochoa C, Perez J. [Seroprevalence of hepatitis C virus in the general population]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. Feb 2002;20(2):64-67.
38. Dominguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Salleras L. Community-based seroepidemiological survey of HCV infection in Catalonia, Spain. *Journal of medical virology*. Dec 2001;65(4):688-693.
39. Lopez-Izquierdo R, Udaondo MA, Zarzosa P, et al. [Seroprevalence of viral hepatitis in a representative general population of an urban public health area in Castilla y Leon (Spain)]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. May 2007;25(5):317-323.
40. Riestra S, Fernandez E, Leiva P, Garcia S, Ocio G, Rodrigo L. Prevalence of hepatitis C virus infection in the general population of northern Spain. *European journal of gastroenterology & hepatology*. May 2001;13(5):477-481.
41. Suarez A, Navascues CA, Garcia R, et al. [The prevalence of markers for the hepatitis A and B viruses in the population of Gijon between 6 and 25 years old]. *Medicina clinica*. Apr 6 1996;106(13):491-494.
42. Ministry of Health. Strategic Plan for tackling Hepatitis C in the Spanish National Health. 2015; http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/docs/plan_e_strategico_hepatitis_C.pdf. Accessed 19 February 2019.
43. Gomez-Escolar Viejo L, Garcia Herola A, Saez Lloret I, et al. Screening of hepatitis C virus infection in adult general population in Spain. *European journal of gastroenterology & hepatology*. Sep 2018;30(9):1077-1081.

44. Polaris Observatory HCVC. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*. Mar 2017;2(3):161-176.
45. World Health Organization. Global hepatitis report, 2017. 2017; (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>). Accessed 19 February 2019.
46. Pepin J, Abou Chakra CN, Pepin E, Nault V, Valiquette L. Evolution of the global burden of viral infections from unsafe medical injections, 2000-2010. *PloS one*. 2014;9(6):e99677.
47. Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *Journal of hepatology*. Oct 2006;45(4):607-616.
48. Danta M, Brown D, Bhagani S, et al. Recent epidemic of acute hepatitis C virus in HIV-positive men who have sex with men linked to high-risk sexual behaviours. *Aids*. May 11 2007;21(8):983-991.
49. Esteban JI, Saucedo S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of hepatology*. Jan 2008;48(1):148-162.
50. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *The Journal of general virology*. Nov 2004;85(Pt 11):3173-3188.
51. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *The Journal of general virology*. Jul 2000;81(Pt 7):1631-1648.
52. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual review of microbiology*. 1997;51:151-178.
53. Burke KP, Cox AL. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. *Immunologic research*. Jul 2010;47(1-3):216-227.
54. Pawlotsky JM. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology*. Jul 2016;151(1):70-86.
55. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology*. Feb 2007;132(2):667-678.
56. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. May 1994;19(5):1321-1324.
57. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. Jan 2014;59(1):318-327.
58. Martell M, Esteban JI, Quer J, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of virology*. May 1992;66(5):3225-3229.
59. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. Jan 2015;61(1):77-87.
60. Pybus OG, Barnes E, Taggart R, et al. Genetic history of hepatitis C virus in East Asia. *Journal of virology*. Jan 2009;83(2):1071-1082.
61. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *The Journal of infectious diseases*. Jun 1995;171(6):1607-1610.
62. Aguilera A, Navarro D, Rodriguez-Frias F, et al. Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes in Spain during the 2000-2015 period (the GEHEP 005 study). *Journal of viral hepatitis*. Sep 2017;24(9):725-732.
63. Echevarria JM, Leon P, Pozo F, Avellon A. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996-2004). *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. Jan 2006;24(1):20-25.
64. Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, et al. The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS medicine*. Dec 2009;6(12):e1000198.
65. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology*. 2011;6:425-456.
66. Schaffner F, Poper H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology*. Mar 1963;44:239-242.
67. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*. Jan 2008;88(1):125-172.

68. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. May 2008;134(6):1655-1669.
69. Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. Aug 2010;7(8):425-436.
70. Sebastiani G, Gkouvatsos K, Pantopoulos K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World journal of gastroenterology*. Aug 28 2014;20(32):11033-11053.
71. Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology*. Feb 2006;43(2 Suppl 1):S82-88.
72. Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Annals of hepatology*. Oct-Dec 2009;8(4):283-291.
73. Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. Aug 2018;68-69:435-451.
74. Sporea I, Popescu A, Sirlu R. Why, who and how should perform liver biopsy in chronic liver diseases. *World journal of gastroenterology*. Jun 7 2008;14(21):3396-3402.
75. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*. Jun 1995;22(6):696-699.
76. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. Aug 1996;24(2):289-293.
77. Wanless IR, Sweeney G, Dhillon AP, et al. Lack of progressive hepatic fibrosis during long-term therapy with deferiprone in subjects with transfusion-dependent beta-thalassemia. *Blood*. Sep 1 2002;100(5):1566-1569.
78. Bedossa P, Carrat F. Liver biopsy: the best, not the gold standard. *Journal of hepatology*. Jan 2009;50(1):1-3.
79. Almpanis Z, Demonakou M, Tiniakos D. Evaluation of liver fibrosis: "Something old, something new...". *Annals of gastroenterology*. Oct-Dec 2016;29(4):445-453.
80. Wilder J, Patel K. The clinical utility of FibroScan((R)) as a noninvasive diagnostic test for liver disease. *Medical devices*. 2014;7:107-114.
81. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *Journal of hepatology*. 2019;In Press.
82. AASLD-IDSA. Hepatitis C Guidance 2018 Update: AASLD-IDSA Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;67(10):1477-1492.
83. European Association for the Study of the Liver. Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *Journal of hepatology*. 2017;66:153-194.
84. Ministry of Health. Strategic Plan for tackling Hepatitis C in the Spanish National Health: Update Second Strategy Line. 2017; <https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITISC/docs/actualizacionEstrategiaTerapeuticaJunio2017.pdf>. Accessed 20 February 2019.
85. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. Mar 22 1997;349(9055):825-832.
86. Ostapowicz G, Watson KJ, Locarnini SA, Desmond PV. Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology*. Jun 1998;27(6):1730-1735.
87. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *Jama*. Jul 26 2000;284(4):450-456.
88. Rueger S, Bochud PY, Dufour JF, et al. Impact of common risk factors of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut*. Oct 2015;64(10):1605-1615.
89. Everhart JE, Lok AS, Kim HY, et al. Weight-related effects on disease progression in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Gastroenterology*. Aug 2009;137(2):549-557.
90. Konerman MA, Mehta SH, Sutcliffe CG, et al. Fibrosis progression in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting adults: prospective analysis of 435 liver biopsy pairs. *Hepatology*. Mar 2014;59(3):767-775.
91. Negro F, Clement S. Impact of obesity, steatosis and insulin resistance on progression and response to therapy of hepatitis C. *Journal of viral hepatitis*. Oct 2009;16(10):681-688.

92. Hui JM, Sud A, Farrell GC, et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology*. Dec 2003;125(6):1695-1704.
93. Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology*. Sep 2002;36(3):729-736.
94. Mallat A, Hezode C, Lotersztajn S. Environmental factors as disease accelerators during chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*. Apr 2008;48(4):657-665.
95. El-Serag HB, Kramer J, Duan Z, Kanwal F. Racial differences in the progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in HCV-infected veterans. *The American journal of gastroenterology*. Sep 2014;109(9):1427-1435.
96. Macias J, Berenguer J, Japon MA, et al. Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfectd with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology*. Oct 2009;50(4):1056-1063.
97. Kruse RL, Kramer JR, Tyson GL, et al. Clinical outcomes of hepatitis B virus coinfection in a United States cohort of hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology*. Dec 2014;60(6):1871-1878.
98. Kanwal F, Kramer JR, Ilyas J, Duan Z, El-Serag HB. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology*. Jul 2014;60(1):98-105.
99. Probst A, Dang T, Bochud M, Egger M, Negro F, Bochud PY. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. *Journal of viral hepatitis*. Nov 2011;18(11):745-759.
100. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *The New England journal of medicine*. Dec 18 1986;315(25):1575-1578.
101. Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, et al. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clinical pharmacology and therapeutics*. Nov 2000;68(5):556-567.
102. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *The New England journal of medicine*. Dec 7 2000;343(23):1666-1672.
103. Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. Aug 18 2005;436(7053):967-972.
104. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *The New England journal of medicine*. Nov 19 1998;339(21):1493-1499.
105. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *The New England journal of medicine*. Nov 19 1998;339(21):1485-1492.
106. Jakobsen JC, Nielsen EE, Feinberg J, et al. Direct-acting antivirals for chronic hepatitis C. *The Cochrane database of systematic reviews*. Jun 6 2017;6:CD012143.
107. Feld JJ, Jacobson IM, Hezode C, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *The New England journal of medicine*. Dec 31 2015;373(27):2599-2607.
108. Foster GR, Afdhal N, Roberts SK, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 2 and 3 Infection. *The New England journal of medicine*. Dec 31 2015;373(27):2608-2617.
109. Kwo PY, Poordad F, Asatryan A, et al. Glecaprevir and pibrentasvir yield high response rates in patients with HCV genotype 1-6 without cirrhosis. *Journal of hepatology*. Aug 2017;67(2):263-271.
110. European Medicines Agency. Direct-acting antivirals indicated for treatment of hepatitis C (interferon-free). 2018; <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/direct-acting-antivirals-indicated-treatment-hepatitis-c-interferon-free>. Accessed 20 February 2019.
111. Food and Drugs Administration. Hepatitis B and C Treatments. 2018; <https://www.fda.gov/forpatients/illness/hepatitisbc/ucm408658.htm>. Accessed 20 February 2019.

112. Ministry of Health. Strategic Plan for tackling Hepatitis C in the Spanish National Health: Update October 2018. 2018
[https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITISC/docs/Plan_Estrategico_Abordaje_Hepatitis_C_\(PEAHC\).pdf](https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITISC/docs/Plan_Estrategico_Abordaje_Hepatitis_C_(PEAHC).pdf). Accessed 20 February 2018.
113. Emmanuel B, Wilson EM, O'Brien TR, Kottlil S, Lau G. Shortening the duration of therapy for chronic hepatitis C infection. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*. Nov 2017;2(11):832-836.
114. Kohli A, Kattakuzhy S, Sidharthan S, et al. Four-Week Direct-Acting Antiviral Regimens in Noncirrhotic Patients With Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection: An Open-Label, Nonrandomized Trial. *Annals of internal medicine*. Dec 15 2015;163(12):899-907.
115. Kohli A, Osinusi A, Sims Z, et al. Virological response after 6 week triple-drug regimens for hepatitis C: a proof-of-concept phase 2A cohort study. *Lancet*. Mar 21 2015;385(9973):1107-1113.
116. Sulkowski MS, Flamm S, Kayali Z, et al. Short-duration treatment for chronic hepatitis C virus with daclatasvir, asunaprevir, beclabuvir and sofosbuvir (FOURward study). *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. Jun 2017;37(6):836-842.
117. Lau G, Benhamou Y, Chen G, et al. Efficacy and safety of 3-week response-guided triple direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C infection: a phase 2, open-label, proof-of-concept study. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*. Oct 2016;1(2):97-104.
118. Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. Sep 2003;38(3):645-652.
119. Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P, et al. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology*. May 2006;43(5):954-960.
120. Health Nlo. NIH consensus statement on management of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:S3-S20.
121. Maasoumy B, Vermehren J, Welker MW, et al. Clinical value of on-treatment HCV RNA levels during different sofosbuvir-based antiviral regimens. *Journal of hepatology*. Sep 2016;65(3):473-482.
122. Perelson AS, Guedj J. Modelling hepatitis C therapy--predicting effects of treatment. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. Aug 2015;12(8):437-445.
123. Sidharthan S, Kohli A, Sims Z, et al. Utility of hepatitis C viral load monitoring on direct-acting antiviral therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Jun 15 2015;60(12):1743-1751.
124. Thornton K, Deming P, Manch RA, et al. Is response guided therapy dead? Low cure rates in patients with detectable hepatitis C virus at week 4 of treatment. *Hepatology international*. Jul 2016;10(4):624-631.
125. Maasoumy B, Vermehren J. Diagnostics in hepatitis C: The end of response-guided therapy? *Journal of hepatology*. Oct 2016;65(1 Suppl):S67-S81.
126. Poynard T, McHutchison J, Manns M, et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. May 2002;122(5):1303-1313.
127. Cacoub P, Desbois AC, Comarmond C, Saadoun D. Impact of sustained virological response on the extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C: a meta-analysis. *Gut*. Nov 2018;67(11):2025-2034.
128. Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, Belperio P, Halloran J, Mole LA. A sustained virologic response reduces risk of all-cause mortality in patients with hepatitis C. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. Jun 2011;9(6):509-516 e501.
129. Waziry R, Hajarizadeh B, Grebely J, et al. Hepatocellular carcinoma risk following direct-acting antiviral HCV therapy: A systematic review, meta-analyses, and meta-regression. *Journal of hepatology*. Dec 2017;67(6):1204-1212.
130. Singh S, Facciorusso A, Loomba R, Falck-Ytter YT. Magnitude and Kinetics of Decrease in Liver Stiffness After Antiviral Therapy in Patients With Chronic Hepatitis C: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the*

-
- official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. Jan 2018;16(1):27-38 e24.
131. Estrabaud E, Vidaud M, Marcellin P, Asselah T. Genomics and HCV infection: progression of fibrosis and treatment response. *Journal of hepatology*. Nov 2012;57(5):1110-1125.
 132. Romero-Gomez M, Eslam M, Ruiz A, Maraver M. Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. Apr 2011;31(4):443-460.
 133. Rau M, Baur K, Geier A. Host genetic variants in the pathogenesis of hepatitis C. *Viruses*. Dec 2012;4(12):3281-3302.
 134. Matsuura K, Tanaka Y. Host genetic variations associated with disease progression in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. Feb 2018;48(2):127-133.
 135. Matsuura K, Tanaka Y. Host genetic variants influencing the clinical course of hepatitis C virus infection. *Journal of medical virology*. Feb 2016;88(2):185-195.
 136. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. Sep 13 1996;273(5281):1516-1517.
 137. Karlsen TH, Melum E, Franke A. The utility of genome-wide association studies in hepatology. *Hepatology*. May 2010;51(5):1833-1842.
 138. Manolio TA, Collins FS. The HapMap and genome-wide association studies in diagnosis and therapy. *Annual review of medicine*. 2009;60:443-456.
 139. Smith MW, Yue ZN, Korth MJ, et al. Hepatitis C virus and liver disease: global transcriptional profiling and identification of potential markers. *Hepatology*. Dec 2003;38(6):1458-1467.
 140. Asselah T, Bieche I, Sabbagh A, et al. Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut*. Jun 2009;58(6):846-858.
 141. Lambert MP, Paliwal A, Vaissiere T, et al. Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *Journal of hepatology*. Apr 2011;54(4):705-715.
 142. Grimes CZ, Hwang LY, Wei P, Shah DP, Volcik KA, Brown EL. Differentially regulated gene expression associated with hepatitis C virus clearance. *The Journal of general virology*. Mar 2013;94(Pt 3):534-542.
 143. Shwetha S, Gouthamchandra K, Chandra M, Ravishankar B, Khaja MN, Das S. Circulating miRNA profile in HCV infected serum: novel insight into pathogenesis. *Scientific reports*. 2013;3:1555.
 144. Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, et al. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterology*. Feb 2014;146(2):562-572.
 145. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. Sep 17 2009;461(7262):399-401.
 146. McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology*. Jun 2010;138(7):2307-2314.
 147. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology*. Jul 2010;139(1):120-129 e118.
 148. Trepo E, Potthoff A, Pradat P, et al. Role of a cirrhosis risk score for the early prediction of fibrosis progression in hepatitis C patients with minimal liver disease. *Journal of hepatology*. Jul 2011;55(1):38-44.
 149. Huang H, Shiffman ML, Friedman S, et al. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. Aug 2007;46(2):297-306.
 150. Tian C, Stokowski RP, Kershenobich D, Ballinger DG, Hinds DA. Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nature genetics*. Jan 2010;42(1):21-23.
 151. Trepo E, Pradat P, Potthoff A, et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. Jul 2011;54(1):60-69.
 152. König IR. Validation in genetic association studies. *Briefings in bioinformatics*. May 2011;12(3):253-258.
 153. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, et al. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*. Dec 1996;144(4):1835-1850.
-

154. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation*. Feb 2009;30(2):E386-394.
155. Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, et al. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *American journal of human genetics*. May 1997;60(5):1107-1121.
156. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, et al. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *American journal of human genetics*. Apr 2003;72(4):804-811.
157. Santoro A, Balbi V, Balducci E, et al. Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease. *PloS one*. Aug 6 2010;5(8):e12037.
158. Hofmann S, Jaksch M, Bezold R, et al. Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Human molecular genetics*. Oct 1997;6(11):1835-1846.
159. Fernandez-Caggiano M, Barallobre-Barreiro J, Rego-Perez I, et al. Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion*. Jul 2013;13(4):263-268.
160. Martikainen MH, Ronnema T, Majamaa K. Association of mitochondrial DNA haplogroups and vascular complications of diabetes mellitus: A population-based study. *Diabetes & vascular disease research*. Jul 2015;12(4):302-304.
161. Rego I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, et al. Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Annals of the rheumatic diseases*. Jan 2010;69(1):210-213.
162. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. Aug 2008;58(8):2387-2396.
163. Knoll N, Jarick I, Volckmar AL, et al. Mitochondrial DNA variants in obesity. *PloS one*. 2014;9(5):e94882.
164. Hart AB, Samuels DC, Hulgán T. The other genome: a systematic review of studies of mitochondrial DNA haplogroups and outcomes of HIV infection and antiretroviral therapy. *AIDS reviews*. Oct-Dec 2013;15(4):213-220.
165. Guzman-Fulgencio M, Jimenez JL, Garcia-Alvarez M, et al. Mitochondrial haplogroups are associated with clinical pattern of AIDS progression in HIV-infected patients. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. Jun 1 2013;63(2):178-183.
166. Guzman-Fulgencio M, Berenguer J, Micheloud D, et al. European mitochondrial haplogroups are associated with CD4+ T cell recovery in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. Oct 2013;68(10):2349-2357.
167. De Luca A, Nasi M, Di Giambenedetto S, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and incidence of lipodystrophy in HIV-infected patients on long-term antiretroviral therapy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. Feb 1 2012;59(2):113-120.
168. Micheloud D, Berenguer J, Guzman-Fulgencio M, et al. European mitochondrial DNA haplogroups and metabolic disorders in HIV/HCV-coinfected patients on highly active antiretroviral therapy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. Dec 1 2011;58(4):371-378.
169. Hulgán T, Haas DW, Haines JL, et al. Mitochondrial haplogroups and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy: an adult AIDS clinical trials group study. *Aids*. Sep 2 2005;19(13):1341-1349.
170. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, et al. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Sep 1999;13(12):1532-1536.
171. Macaulay V, Hill C, Achilli A, et al. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science*. May 13 2005;308(5724):1034-1036.
172. Garcia-Alvarez M, Guzman-Fulgencio M, Berenguer J, et al. European mitochondrial DNA haplogroups and liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus coinfecting patients. *Aids*. Aug 24 2011;25(13):1619-1926.

173. Guzman-Fulgencio M, Rallon N, Berenguer J, et al. European mitochondrial haplogroups are not associated with hepatitis C virus (HCV) treatment response in HIV/HCV-coinfected patients. *HIV medicine*. Aug 2014;15(7):425-430.
174. United Nations Assembly. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. 2015; <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>. Accessed 20 February 2019.
175. Chou R, Cottrell EB, Wasson N, Rahman B, Guise JM. Screening for hepatitis C virus infection in adults: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine*. Jan 15 2013;158(2):101-108.
176. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. Jul 2011;31 Suppl 2:30-60.
177. Denniston MM, Jiles RB, Drobeniuc J, et al. Chronic hepatitis C virus infection in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey 2003 to 2010. *Annals of internal medicine*. Mar 4 2014;160(5):293-300.
178. Ditah I, Al Bawardy B, Gonzalez HC, et al. Lack of health insurance limits the benefits of hepatitis C virus screening: insights from the National Health and Nutrition Examination Hepatitis C follow-up study. *The American journal of gastroenterology*. Aug 2015;110(8):1126-1133.
179. Trooskin SB, Poceta J, Towey CM, et al. Results from a Geographically Focused, Community-Based HCV Screening, Linkage-to-Care and Patient Navigation Program. *Journal of general internal medicine*. Jul 2015;30(7):950-957.
180. World Health Organization. Global report on access to hepatitis C treatment. Focus on overcoming barriers. 2016; <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250625/WHO-HIV-2016.20-eng.pdf?sequence=1>. Accessed 20 February 2019.
181. Hickman M, De Angelis D, Vickerman P, Hutchinson S, Martin NK. Hepatitis C virus treatment as prevention in people who inject drugs: testing the evidence. *Current opinion in infectious diseases*. Dec 2015;28(6):576-582.
182. Linas BP, Wong AY, Schackman BR, Kim AY, Freedberg KA. Cost-effective screening for acute hepatitis C virus infection in HIV-infected men who have sex with men. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Jul 2012;55(2):279-290.
183. Liu S, Cipriano LE, Holodniy M, Goldhaber-Fiebert JD. Cost-effectiveness analysis of risk-factor guided and birth-cohort screening for chronic hepatitis C infection in the United States. *PloS one*. 2013;8(3):e58975.
184. Sutton AJ, Edmunds WJ, Sweeting MJ, Gill ON. The cost-effectiveness of screening and treatment for hepatitis C in prisons in England and Wales: a cost-utility analysis. *Journal of viral hepatitis*. Nov 2008;15(11):797-808.
185. Daniels D, Grytdal S, Wasley A, Centers for Disease C, Prevention. Surveillance for acute viral hepatitis - United States, 2007. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries*. May 22 2009;58(3):1-27.
186. Brogueira P, Costa A, Miranda A, et al. Improve screening of HCV infection by targeting high prevalence aged groups: analysis of a cohort of HCV and HIV co-infected patients. *Journal of the International AIDS Society*. 2014;17(4 Suppl 3):19601.
187. McGarry LJ, Pawar VS, Panchmatia HR, et al. Economic model of a birth cohort screening program for hepatitis C virus. *Hepatology*. May 2012;55(5):1344-1355.
188. Vuppalanchi R, Kwo PY. The cost-effectiveness of birth cohort screening for hepatitis C antibody in US primary care settings. *Gastroenterology*. Feb 2013;144(2):457-459.
189. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Annals of internal medicine*. May 16 2006;144(10):705-714.
190. Smith BD, Morgan RL, Beckett GA, et al. Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*. Aug 17 2012;61(RR-4):1-32.
191. Linas B MJ. Literature review on cost-effectiveness of HCV screening, treatment strategies and applicability to LMICs.

- https://www.who.int/hepatitis/publications/annex_5-2.pdf?ua=1. Accessed 20 February 2019.
192. Barocas JA, Tasillo A, Eftekhari Yazdi G, et al. Population-level Outcomes and Cost-Effectiveness of Expanding the Recommendation for Age-based Hepatitis C Testing in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Aug 1 2018;67(4):549-556.
 193. Deuffic-Burban S, Huneau A, Verleene A, et al. Assessing the cost-effectiveness of hepatitis C screening strategies in France. *Journal of hepatology*. Oct 2018;69(4):785-792.
 194. Eckman MH, Ward JW, Sherman KE. Cost Effectiveness of Universal Screening for Hepatitis C Virus Infection in the Era of Direct-Acting, Pangenotypic Treatment Regimens. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. Sep 8 2018.
 195. Lombardi A, Mondelli MU, Hepatitis ESGfV. Hepatitis C: Is eradication possible? *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. Nov 25 2018.
 196. Khuroo MS, Khuroo NS, Khuroo MS. Diagnostic accuracy of point-of-care tests for hepatitis C virus infection: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2015;10(3):e0121450.
 197. Soulier A, Poiteau L, Rosa I, et al. Dried Blood Spots: A Tool to Ensure Broad Access to Hepatitis C Screening, Diagnosis, and Treatment Monitoring. *The Journal of infectious diseases*. Apr 1 2016;213(7):1087-1095.
 198. Jiang Y, Ellis T, Greenlee AR. Genotyping Parkinson disease-associated mitochondrial polymorphisms. *Clinical medicine & research*. May 2004;2(2):99-106.
 199. Rego-Perez I F-MM, Relación S, Arenas J, Blanco FJ. The Use of Single Base Extension (SBE) for the Assessment of European Mitochondrial DNA Haplogroups in Galician Population. *The Open Cell Development & Biology Journal*. 2008;1(6).
 200. Brandstatter A, Parsons TJ, Parson W. Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *International journal of legal medicine*. Oct 2003;117(5):291-298.
 201. Vallone PM, Just RS, Coble MD, Butler JM, Parsons TJ. A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *International journal of legal medicine*. Jun 2004;118(3):147-157.
 202. Wiesbauer M, Meierhofer D, Mayr JA, Sperl W, Paulweber B, Kofler B. Multiplex primer extension analysis for rapid detection of major European mitochondrial haplogroups. *Electrophoresis*. Oct 2006;27(19):3864-3868.
 203. Macaulay V, Richards M, Hickey E, et al. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *American journal of human genetics*. Jan 1999;64(1):232-249.
 204. Ayuntamiento de A Coruña. Observatorio Sociolaboral. Servicio Municipal de Empleo. Área Empleo y Empresa. 2015. 2016; https://www.coruna.gal/descarga/1453597405083/Poblacion-y-Hogares_Municipio-A-Coruna_2015.pdf. Accessed 20 February 2019.
 205. Xerencia e Xestión Integrada de A Coruña. Memoria 2016 Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña. 2017; <https://xxicoruna.sergas.gal/DAnosaorganizacion/77/Memoria%20XXIAC%202016.pdf>, 20 February 2019.
 206. Mena A, Moldes L, Meijide H, et al. Seroprevalence of HCV and HIV infections by year of birth in Spain: impact of US CDC and USPSTF recommendations for HCV and HIV testing. *PloS one*. 2014;9(12):e113062.
 207. Food and Drugs Administration. Summary of Safety and Effectiveness Data (SSED) for OraQuick® HCV Rapid Antibody Test 2010; https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf8/P080027b.pdf. Accessed 20 February 2019.
 208. OraSure Technologies I. OraQuick HCV Rapid Antibody Teste Customer Letter. 2012; https://orc.orasure.com/assets/base/Extranet/PDFs/OraQuick_HCV_PI_US-ENG.pdf. Accessed 20 February 2019.
 209. Asociación Española para el Estudio del Hígado y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Guías AEEH/SEIMC de manejo de

- la Hepatitis C. 2016; https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/guiasclinicas/seimc-clinicasclinicas-2016-Manejo_HepatitisC.pdf. Accessed 21 February 2019.
210. Jakobsen JC, Nielsen EE, Feinberg J, et al. Direct-acting antivirals for chronic hepatitis C. *The Cochrane database of systematic reviews*. Sep 18 2017;9:CD012143.
 211. Simoni L, Calafell F, Pettener D, Bertranpetit J, Barbujani G. Geographic patterns of mtDNA diversity in Europe. *American journal of human genetics*. Jan 2000;66(1):262-278.
 212. Li X, Zhou TC, Wu CH, et al. Correlations between mitochondrial DNA haplogroup D5 and chronic hepatitis B virus infection in Yunnan, China. *Scientific reports*. Jan 17 2018;8(1):869.
 213. Mansouri A, Gattoliat CH, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology*. Sep 2018;155(3):629-647.
 214. Mehta R, Jeiran K, Koenig AB, et al. The role of mitochondrial genomics in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *BMC medical genetics*. Sep 5 2016;17(1):63.
 215. Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E, et al. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Human molecular genetics*. Sep 1 2010;19(17):3343-3353.
 216. Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Vazquez-Mosquera ME, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of incident knee osteoarthritis in OAI and CHECK cohorts. A meta-analysis and functional study. *Annals of the rheumatic diseases*. Jun 2017;76(6):1114-1122.
 217. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, et al. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases. *Biochimica et biophysica acta*. Feb 2014;1842(2):208-219.
 218. Martinez-Redondo D, Marcuello A, Casajus JA, et al. Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO2max consumer--is it a paradox? *Mitochondrion*. Mar 2010;10(2):102-107.
 219. Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. May 2006;290(5):G847-851.
 220. Hendrickson SL, Hutcheson HB, Ruiz-Pesini E, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression. *Aids*. Nov 30 2008;22(18):2429-2439.
 221. Ballard JW, Katewa SD, Melvin RG, Chan G. Comparative analysis of mitochondrial genotype and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Oct 2007;1114:93-106.
 222. Reiberger T, Ferlitsch A, Sieghart W, et al. HIV-HCV co-infected patients with low CD4+ cell nadirs are at risk for faster fibrosis progression and portal hypertension. *Journal of viral hepatitis*. Jun 2010;17(6):400-409.
 223. Moretti S, Marcellini S, Boschini A, et al. Apoptosis and apoptosis-associated perturbations of peripheral blood lymphocytes during HIV infection: comparison between AIDS patients and asymptomatic long-term non-progressors. *Clinical and experimental immunology*. Dec 2000;122(3):364-373.
 224. Treitinger A, Spada C, Verdi JC, et al. Decreased antioxidant defence in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *European journal of clinical investigation*. May 2000;30(5):454-459.
 225. Kamal SM, Nasser IA. Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know. *Hepatology*. Apr 2008;47(4):1371-1383.
 226. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *Journal of hepatology*. May 2001;34(5):730-739.
 227. Maida I, Soriano V, Barreiro P, Rivas P, Labarga P, Nunez M. Liver fibrosis stage and HCV genotype distribution in HIV-HCV coinfectd patients with persistently normal transaminases. *AIDS research and human retroviruses*. Jun 2007;23(6):801-804.
 228. Kamal SM, Turner B, He Q, et al. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. *Hepatology*. Apr 2006;43(4):771-779.
 229. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*. Oct 2 1998;282(5386):103-107.

- 230. Chatterjee A, Guedj J, Perelson AS. Mathematical modelling of HCV infection: what can it teach us in the era of direct-acting antiviral agents? *Antiviral therapy*. 2012;17(6 Pt B):1171-1182.
- 231. Guedj J, Dahari H, Rong L, et al. Modeling shows that the NS5A inhibitor daclatasvir has two modes of action and yields a shorter estimate of the hepatitis C virus half-life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 5 2013;110(10):3991-3996.
- 232. Hezode C, Chevaliez S, Scoazec G, et al. P0843: On-treatment viral kinetics do not predict SVR in patients with advanced liver disease receiving sofosbuvir in combination with daclatasvir or simeprevir for 12 weeks. *Journal of hepatology*. 2015;62:S654-S655.
- 233. Laouenan C, Marcellin P, Lapalus M, et al. Using pharmacokinetic and viral kinetic modeling to estimate the antiviral effectiveness of telaprevir, boceprevir, and pegylated interferon during triple therapy in treatment-experienced hepatitis C virus-infected cirrhotic patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Sep 2014;58(9):5332-5341.

XII.- ANEXOS

ANEXO A.- Modelo de Consentimiento Informado para la participación en la línea de investigación de Enfermedades Infecciosas



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE | Xerencia Xestión Integrada
A Coruña

HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

TÍTULO: COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

IDENTIDAD RESPONSABLE: DR. JOSÉ DOMINGO PEDREIRA ANDRADE.

SERVICIO MÉDICO / GRUPO DE INVESTIGACIÓN: SERVICIO DE MEDICINA INTERNA DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO A CORUÑA (CHUAC) - XERENCIA XESTION INTEGRADA A CORUÑA (XXIAC). INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE A CORUÑA (INIBIC)

D. / Dña.:.....

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

INTRODUCCIÓN.-

Le proponemos participar en la creación de una colección de muestras para su uso en la investigación de las enfermedades infecciosas.

Toda investigación biomédica sobre enfermedades requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar. Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma.

Este documento se le proporciona con el fin de darle información suficiente para que pueda entender los posibles riesgos y beneficios derivados de su participación en esta línea de

investigación, decidiendo si desea ser incluido o no en la misma. Antes de tomar su decisión, lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como desee hasta asegurarse de que lo ha entendido y desea participar.

Su participación en esta Línea de Investigación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura.

El objetivo principal de la Colección de Muestras para la Investigación de Enfermedades Infecciosas es poder utilizar estas muestras en los distintos proyectos de investigación en los que participe el responsable de la misma, el Dr. José Domingo Pedreira Andrade y cualquier otro personal adscrito o colaborador del Grupo de Investigación del Servicio de Medicina Interna del CHUAC – XXIAC y/o del INIBIC; siempre y cuando, dichos estudios se enmarquen en el análisis de las enfermedades infecciosas en general, y particularmente aquellas enfermedades infecciosas causadas por virus.

Debe saber que la realización de todos estos proyectos de investigación en los que se utilicen estas muestras, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.

La finalidad principal de esta colección de muestras y de las investigaciones en las que se participe, es progresar en el conocimiento de la patología a estudiar y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento, tanto médico como quirúrgico. Para ello y, dentro de la propia labor asistencial que realizamos con pacientes como usted, obtendremos diferentes muestras biológicas para analizar y estudiar. Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios. Sin embargo, hay ocasiones en que estas muestras sobrantes son insuficientes y es necesario obtener alguna pequeña muestra adicional.

Lo que le solicitamos es AUTORIZACIÓN para ubicar, en la colección que le hemos descrito:

- **MUESTRAS** (Indicar las muestras que se van a obtener en el supuesto particular), que se le han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario y que ya no es necesario utilizarlas para la finalidad por la que se obtuvieron, y que siguiendo la normativa de eliminación de residuos biológicos, serían destruidas.
- **INFORMACIÓN CLÍNICA** que nos permita analizar conjuntamente los resultados clínicos y los resultados derivados de las técnicas con las que se analicen las muestras.

Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra.

Las condiciones de conservación y uso de dicha información serán las indicadas en el apartado de Confidencialidad de este documento.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras líquidas y/o tejidos) para realizar los estudios de investigación biomédica dentro del área de las enfermedades infecciosas, sin que este hecho le cause molestias adicionales al propio proceso asistencial. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones del CHUAC - XXIAC, bajo la responsabilidad del **Dr. José Domingo Pedreira Andrade**.

Es muy importante subrayar que, **para la obtención de dicha muestra, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional al inherente al proceso asistencial al que va a ser sometido.**

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles.

RIESGOS.-

La obtención de las muestras antes descritas se realizará como parte del proceso asistencial que se le proporciona en este centro. Usted no sufrirá ningún riesgo adicional por donar estas muestras a investigación.

COMPENSACIÓN Y BENEFICIOS.-

Usted no obtendrá ningún beneficio económico directo por su participación en los estudios de investigación que se lleven a cabo con sus muestras, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica.

La posibilidad de estudiar sus muestras, puede beneficiar en el futuro a pacientes con las enfermedades que se van a estudiar dentro de esta línea de investigación o enfermedades relacionadas con la misma. No obstante, dado que las investigaciones pueden durar años, es posible que usted no obtenga un beneficio directo de los resultados.

CONFIDENCIALIDAD.-

Toda la información que se obtenga de analizar sus muestras, así como toda la información clínica referente a usted utilizada en esta línea de investigación, será considerada confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM) y las normas de desarrollo de ambas leyes.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde su entrada en esta ***Colección de Muestras para la Investigación de Enfermedades Infecciosas, del Grupo de Investigación del Servicio de Medicina Interna del CHUAC-XXIAC, INIBIC***, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado del Grupo de Investigación del Servicio de Medicina Interna del CHUAC-XXIAC, INIBIC, en una base de datos de gestión de información que cumple todos los requisitos legales exigidos, tanto por la LOPD como por la LIBM y las normativas que las desarrollan. En base a todo ello, le informamos que se adoptarán todas las medidas necesarias para que tal información, no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

Es importante que entienda, que es posible que sus muestras y los datos asociados a las mismas sean cedidas a otros investigadores, nacionales o internacionales, que colaboren en nuestras investigaciones; o que algunas de las técnicas necesarias para el análisis de sus muestras se realicen en otros centros colaboradores, ubicados en ocasiones en territorio nacional y en otras en el extranjero. En todo caso, le informamos que dichas **cesiones siempre se efectuarán de un modo no identificable, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos (sexo, patología, peso, edad,...) y codificados, que evitarán que el receptor de la muestra pueda conocer su identidad**. A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española de protección de datos de carácter personal, y que, nos proporcionen información referente a la trazabilidad de la muestra y, nos notifiquen la destrucción o devolución de la muestra sobrante, una vez finalizados los estudios que a ellos les correspondan hacer. Usted puede autorizarnos o no a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja de firma del consentimiento informado.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar en este estudio de investigación, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española de protección de datos, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA**, en la *Consulta* del Servicio de Medicina Interna del CHUAC, a la atención de Dr. José Domingo Pedreira Andrade

- **CORREO POSTAL:**

Dr. José Domingo Pedreira Andrade
Servicio de Medicina Interna. Planta 9, Hospital A Coruña.
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña – Xerencia Xestión Integrada A Coruña
As Xubias, 84. A Coruña. 15006

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar al Servicio de Medicina Interna del CHUAC, a la atención de Dr. José Domingo Pedreira Andrade la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento.

Una vez cubiertos todos los campos puede hacérselos llegar de cualquiera de las maneras descritas anteriormente.

INFORMACIÓN ADICIONAL.- Usted puede contactar con el médico responsable de este estudio, si le surge cualquier duda sobre su participación en esta línea de investigación o sobre sus derechos como paciente, en el **Teléfono: 981 178189**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

HALLAZGOS Y RESULTADOS.-

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

Usted debe saber que, en cumplimiento de la LIBM, tiene derecho a conocer o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.

DESTINO DE LA MUESTRA UNA VEZ FINALIZADO EL PROYECTO DE INVESTIGACION.-

En una segunda fase, cuando así lo estime conveniente el investigador responsable de la custodia de su muestra, **Dr. José Domingo Pedreira Andrade**, y siempre en el supuesto de que las muestras no se hubiesen agotado, el remanente será almacenado en el **Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC – XXIAC)**.

El Biobanco es un banco de almacenamiento de muestras de origen humano bajo criterios de calidad, para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo

de la biomedicina. Su funcionamiento se centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas, tal y como establece la LIBM y la normativa que la complementa.

El remanente de sus muestras será enviado al Biobanco-C.H.U.A.C, para ser almacenadas en las instalaciones de dicho Banco de Muestras y, posteriormente, ser cedidas a los investigadores que hayan pasado la aprobación del Comité de Ética y del Comité Científico del Biobanco. A los estudios de investigación para los que se quieran utilizar las muestras almacenadas en el Biobanco-C.H.U.A.C, se les exigirá tener la aceptación del Comité de Ética correspondiente, tal y como se establece en la normativa aplicable. Las cesiones de muestras para su utilización en un proyecto de investigación internacional se realizarán siguiendo las pautas establecidas para estos supuestos en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal y en el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad, su muestra sólo irá identificada desde su entrada en el Biobanco con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por el personal autorizado del Biobanco en una base de datos de gestión de información que cumple todos los requisitos legales exigidos tanto por la LOPD como por la LIBM y las normativas que las desarrollan, en base a todo ello le informamos que se adoptarán todas las medidas necesarias para que tal información no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el deber legal de guardar secreto. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos por si fuera información de interés clínico.

Es importante que entienda que la cesión de las muestras a los investigadores que nos las soliciten, siempre se efectuará de un modo no identificable, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos (sexo, patología, peso, edad,...) y codificados que evitarán que el investigador receptor de la muestra pueda conocer su identidad. . A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española de protección de datos de carácter personal, y que, nos proporcionen información referente a la trazabilidad de la muestra y, nos notifiquen la destrucción o devolución de la muestra sobrante, una vez finalizada la investigación para la que se le autorizó a usar la muestra. Usted puede autorizarnos o no a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja de firma del consentimiento informado.

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles.

RESTRICCIONES DE USO.-

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

INFORMACIÓN DISPONIBLE PARA EL PARTICIPANTE.-

El Biobanco y/o la persona responsable de la colección o proyecto de investigación tendrán a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos.

En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada.

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web del CHUAC www.hospitalcoruna.es y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web www.isciii.es, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

FECHA FIRMA CONSENTIMIENTO: _____

Yo,..... (Nombre del participante) confirmo que,

-He leído la información que se me ha entregado.

-He recibido suficiente información sobre la **Colección de Muestras para la Investigación de Enfermedades Infecciosas**

-He podido hacer preguntas sobre la misma.

-He hablado de ello con..... (Nombre del médico que obtiene la muestra)

-Comprendo que mi participación es voluntaria.

-Comprendo que puedo retirar mi consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

-Presto libremente mi conformidad para participar en esta Colección de muestras para investigación.

-Autorizo a que obtengan las muestras antes indicadas en la Hoja de Información que me han facilitado: NO SI

-Autorizo a que consulten y obtengan información de mis datos clínicos: NO SI

-Acepto que contacten conmigo cuando sea necesario: NO SI

TELÉFONO:.....

-Quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud:

NO SI TELÉFONO:.....

-Autorizo a que mis muestras y datos sean cedidas, en las condiciones indicadas, a centros colaboradores:

• Nacionales NO SI

• Internacionales NO SI

RESTRICCIONES DE USO: No autorizo a utilizar mis muestras en investigaciones que

.....

.....

.....

-Autorizo a que el remante de mis muestras sea depositado en el **Biobanco-CHUAC** cuando lo considere oportuno el investigador responsable de mis muestras: NO SI

Firma del participante

Sr. /Sra.....

/Sra.....

Médico

Sr.

Firma del tutor o representantes legales

(Tachar lo que no proceda)

Sr. /Sra.....

/Sra.....

Sr.

Firma en aquellos casos en los que el participante no tenga capacidad legal.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD ANTE TESTIGOS

(Firmar en aquellos supuestos en los que el participante, con capacidad suficiente para dar su autorización, no pueda escribir)

FECHA FIRMA CONSENTIMIENTO: _____

Yo, _____ (*nombre del acompañante del participante*),
con DNI: _____ y en calidad de _____ (*parentesco con el donante*) certifico que a _____ (*nombre del participante*)

-Se le ha leído la información que se le ha entregado.

-Ha recibido suficiente información sobre la **Colección de Muestras para la Investigación de Enfermedades Infecciosas**.

-Ha podido hacer preguntas sobre la misma.

-Ha hablado de ello con..... (*Nombre del médico que obtiene la muestra*)

-Comprende que su participación es voluntaria.

-Comprende que puede retirar su consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

-Presta libremente su conformidad para participar en esta Colección de muestras para investigación.

-Autoriza a que obtengan las muestras antes indicadas en la Hoja de Información que le han facilitado: NO SI

-Autoriza a que consulten y obtengan información de sus datos clínicos: NO SI

-Acepta que contacten con él/ella cuando sea necesario: NO SI

TELÉFONO:.....

-Quiere ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para su salud:

NO SI TELÉFONO:.....

-Autoriza a que sus muestras y datos sean cedidos, en las condiciones indicadas, a centros colaboradores:

- Nacionales NO SI

- Internacionales NO SI

RESTRICCIONES DE USO: No autoriza a utilizar sus muestras en investigaciones que

.....

.....

.....

-Autoriza a que el remante de sus muestras sea depositado en el **Biobanco-CHUAC** cuando lo considere oportuno el investigador responsable de sus muestras: NO SI

Me autoriza a firmar en su nombre.

Firma del testigo

Sr. /Sra.....

/Sra.....

Médico

Sr.



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña.....con DNIrevoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20..... Y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña.....con DNI.....
Como representante legal de D/Dña....., con DNI.....,
Revoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE SUS DATOS PERSONALES.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE SUS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

ANEXO B.- Hoja de recogida de datos del paciente del Estudio 1

| Variables sociodemográficas y epidemiológicas | | | |
|---|---|--|-------------------------------------|
| Año de nacimiento | | | |
| Nacionalidad | | | |
| Género | <input type="checkbox"/> Varón | <input type="checkbox"/> Mujer | <input type="checkbox"/> Transexual |
| Etnia | | | |
| Fumador | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Ex-fumador |
| En caso afirmativo especificar nº cigarrillos/día | | | |
| Consumo alcohol >30g/día | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Ex-bebedor |
| Consumo activo de drogas (especificar) | | | |
| Comorbilidad | <input type="checkbox"/> Ósea | <input type="checkbox"/> Toxicidad renal | |
| En caso afirmativo indicar tipo de comorbilidad | <input type="checkbox"/> Cardiovascular | <input type="checkbox"/> Neuropsiquiátrica | |
| | <input type="checkbox"/> Diabetes | <input type="checkbox"/> Digestiva | |
| Parámetros bioquímicos | | | |
| AST/ALT/GGT (UI/L) | | | |
| Infección por VIH | | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No |
| Fecha de diagnóstico VIH | | | |
| Vía de transmisión VIH | | | |
| Recuento basal linfocitos T CD4+ (células/ μ L) | | | |
| Último recuento linfocitos T CD4+ (células/ μ L) | | | |
| Nadir linfocitos T CD4+ (células/ μ L) | | | |
| SIDA al diagnóstico | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |
| En caso afirmativo definir evento | | | |
| ARN-VIH log basal (copias/mL) | | | |
| TAR actual | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |
| En caso afirmativo definir pauta | | | |
| ARN-VIH < 50 copias/mL | | | |
| Infección por VHC | | | |
| Fecha de diagnóstico VHC | | | |
| Vía de transmisión VHC | | | |
| Genotipo/subtipo VHC | | | |
| ARN-VHC log basal (log UI/mL) | | | |
| <i>FibroScan</i> actual (kPa) | | | |
| Tiempo desde el diagnóstico hasta el <i>FibroScan</i> actual (años) | | | |
| Cirrosis hepática (>12,5 kPa) | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |
| Descompensación hepática | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |
| En caso afirmativo definir evento | | | |
| Tratamiento activo VHC | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |

ANEXO C.- Hoja de recogida de datos del paciente del Estudio 2

| Variables sociodemográficas y epidemiológicas | | | |
|--|---|--|-------------------------------------|
| Año de nacimiento | | | |
| Nacionalidad | | | |
| Género | <input type="checkbox"/> Varón | <input type="checkbox"/> Mujer | <input type="checkbox"/> Transexual |
| Etnia | | | |
| Fumador | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Ex-fumador |
| En caso afirmativo especificar nº cigarrillos/día | | | |
| Consumo alcohol >30g/día | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Ex-bebedor |
| Consumo activo de drogas (especificar) | | | |
| Comorbilidad | <input type="checkbox"/> Ósea | <input type="checkbox"/> Toxicidad renal | |
| En caso afirmativo indicar tipo de comorbilidad | | | |
| | <input type="checkbox"/> Cardiovascular | <input type="checkbox"/> Neuropsiquiátrica | |
| | <input type="checkbox"/> Diabetes | <input type="checkbox"/> Digestiva | |
| Parámetros bioquímicos basales | | | |
| AST/ALT/GGT (UI/L) | | | |
| Infección por VIH | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |
| TAR momento basal (definir pauta) | | | |
| ARN-VIH < 50 copias/mL | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |
| Recuento linfocitos T-CD4+ (cel/μL) | | | |
| Infección por VHC | | | |
| Fecha de diagnóstico VHC | | | |
| Vía de transmisión VHC | | | |
| Genotipo/subtipo VHC | | | |
| FibroScan actual (kPa) | | | |
| Cirrosis hepática (12,5 kPa) | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |
| Descompensación hepática | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |
| En caso afirmativo especificar | | | |
| Exposición previa a tratamiento | <input type="checkbox"/> Pretratado | <input type="checkbox"/> Naïve | |
| En caso de ser pretratado, indicar pauta previa y tipo de respuesta obtenida | | | |
| Pauta de tratamiento estudio | | | |
| RBV | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |
| Duración del tratamiento | <input type="checkbox"/> 12 semanas | <input type="checkbox"/> 24 semanas | |
| Carga viral VHC EOT (UI/mL) | | | |
| RVS ₁₂ | <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> No | |

ANEXO D.- Modelo de Consentimiento Informado para la participación en el programa de cribado



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE

HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

TÍTULO: DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VHC EN EL NORTE DE ESPAÑA: HACIA LA ERRADICACIÓN DEL VHC.

IDENTIDAD RESPONSABLE: DRA. EVA POVEDA LÓPEZ.

SERVICIO MÉDICO / GRUPO DE INVESTIGACIÓN: GRUPO INVESTIGACION VIROLOGIA CLINICA. SERVICIO DE MEDICINA INTERNA. XERENCIA XESTION INTEGRADA A CORUÑA (XXIAC). INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE A CORUÑA (INIBIC)

IDENTIDAD RESPONSABLE OBTENCIÓN:

CENTRO OBTENCIÓN:

D. / Dña.:

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

INTRODUCCIÓN.-

Le proponemos participar en un proyecto de investigación piloto en la población del área sanitaria de Coruña, que tiene por finalidad detectar posibles casos de Virus de Hepatitis C (VHC) asintomáticos, es decir, personas que pueden tener en su organismo el VHC pero que no han desarrollado ninguna enfermedad y no presentan ningún tipo de malestar o síntoma.

Toda investigación biomédica sobre enfermedades requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar. Las muestras

obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma.

Este documento se le proporciona con el fin de darle información suficiente para que pueda entender los posibles riesgos y beneficios derivados de su participación en esta línea de investigación, decidiendo si desea ser incluido o no en la misma. Antes de tomar su decisión, lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como desee hasta asegurarse de que lo ha entendido y desea participar.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura.

El objetivo principal del Proyecto de Investigación: ***“Detección de la infección por el VHC en el Norte de España: Hacia la erradicación del VHC”*** es detectar posibles casos de VHC asintomáticos, es decir, personas que pueden tener en su organismo el VHC pero que no han desarrollado ninguna enfermedad y no presentan ningún tipo de malestar o síntoma. Recientes estudios internacionales han evidenciado que un porcentaje bastante amplio de población está afectado por esta infección y hasta que empiezan a presentar síntomas de enfermedad no se les detecta.

Lo que necesitamos de usted es que nos autorice para realizarle una prueba muy sencilla y que no repercute ningún riesgo para las personas, con la que detectaremos posibles infectados.

La prueba consiste en introducir un bastoncillo específico para estos test, en la boca de los participantes para obtener muestras de saliva que dirá si es o no positivo para VHC.

A aquellos participantes cuyo test dé positivo se les obtendrá una muestra de sangre para realizar una analítica específica que confirme el positivo en VHC.

De ser el resultado nuevamente positivo, el participante será derivado por su médico de atención primaria al especialista que le corresponda para que le efectúe las pruebas y seguimiento clínico oportuno para su caso concreto.

Para este estudio también necesitaremos recabar información clínica que nos permita analizar los resultados obtenidos con el test antes indicado con sus antecedentes clínicos. Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos a los participantes en los estudios, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información necesaria para intentar detectar los datos relevantes desde la perspectiva del diagnóstico, pronóstico y terapias de la patología objeto del estudio. Las condiciones de conservación y uso de dicha información serán las indicadas en el apartado de Confidencialidad de este documento.

RIESGOS.-

Tal y como ya le hemos indicado previamente, el test de detección rápido no implica ningún tipo de riesgo, simplemente consistirá en introducir en su boca un bastoncillo y obtener la muestra de saliva necesaria para que el dispositivo indique si es positivo o negativo. El test se le realizará aprovechando una de las visitas que realice a su médico de atención primaria.

COMPENSACIÓN Y BENEFICIOS.-

Usted no obtendrá ningún beneficio económico directo por su participación en los estudios de investigación que se lleven a cabo con los datos obtenidos, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica.

CONFIDENCIALIDAD.-

Toda la información que se obtenga usted utilizada en esta investigación, será considerada confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM) y las normas de desarrollo de ambas leyes.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información no se relaciona con su identidad), su información sólo irá identificada desde su entrada en esta **investigación**, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el responsable de la obtención de sus datos, y el personal autorizado del Grupo de Investigación de Virología Clínica del Servicio de Medicina Interna del CHUAC-XXIAC, INIBIC, en una base de datos de gestión de información que cumple todos los requisitos legales exigidos, tanto por la LOPD como por la LIBM y las normativas que las desarrollan. En base a todo ello, le informamos que se adoptarán todas las medidas necesarias para que tal información, no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**.

Es importante que entienda, que es posible los datos derivados de este estudio sean cedidos a otros investigadores, nacionales o internacionales, que colaboren en nuestras investigaciones. En todo caso, le informamos que dichas **cesiones siempre se efectuarán de un modo no identificable, es decir, sólo se cederán datos genéricos (sexo, patología, peso, edad,...) y codificados, que evitarán que el receptor de mismos pueda conocer su identidad**. A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española de protección de datos de carácter personal.

Usted puede autorizarnos o no a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja de firma del consentimiento informado.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar en este estudio de investigación, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española de protección de datos, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA,** en la *Consulta* del Médico.....(*nombre del médico que lo ha atendido*) (*nombre del Centro Sanitario en el que ha sido atendido*).
- **CORREO POSTAL:**
Dra. Eva Poveda López
Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC).
Edificio Anexo, Hospital Materno Infantil Teresa Herrera
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña – Xerencia Xestión Integrada A Coruña
As Xubias, 84. A Coruña. 15006

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar al Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC), a la atención de **Dra. Eva Poveda López** la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento. Una vez cubiertos todos los campos puede hacérsela llegar de cualquiera de las maneras descritas anteriormente.

INFORMACIÓN ADICIONAL.- Usted puede contactar con la responsable de este estudio, la Dra. Eva Poveda, si le surge cualquier duda sobre su participación en esta línea de investigación o sobre sus derechos como paciente, en el **Teléfono: 981 176399**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

HALLAZGOS Y RESULTADOS.-

Usted al participar en este estudio puede llegar a conocer que está infectado de VHC aunque no presente ningún tipo de síntoma. Tal y como le hemos explicado anteriormente, en caso de ser positivo, si usted quiere y acepta, su médico de cabecera lo derivará al especialista correspondiente para que analice su caso y le establezca las pautas sanitarias adecuadas a su caso particular.

Usted debe saber que, en cumplimiento de la LIBM, tiene derecho a conocer o no, la información obtenida con su participación en una investigación.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.

■■■■



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña.....con DNIrevoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20..... Y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña.....con DNI.....

Como representante legal de D/Dña....., con DNI.....,

Revoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE SUS DATOS PERSONALES.
- ☐ SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE SUS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....